

# UNIVERSITÀ degli STUDI di PARMA

---

Dottorato di ricerca in  
**Farmacologia e Tossicologia Sperimentali**  
Ciclo XXIII

*Studio del ruolo dei geni ApoE e ACAT2  
sull'eziopatogenesi dell'aterosclerosi e potenziale  
intervento farmacologico*

Tesi di dottorato di  
**Grazia Stomeo**

Coordinatore del dottorato:  
*Chiar.ma Prof.ssa Elisabetta Barocelli*

Tutore:  
*Chiar.mo Prof. Franco Bernini*

Triennio Accademico 2008-2010

*Alla mia famiglia.*

*A Stefano*

## Sommario

<i>Introduzione</i> .....	6
<i>Aterosclerosi</i> .....	7
<i>Trasporto inverso del colesterolo</i> .....	8
<i>Efflusso cellulare di colesterolo</i> .....	10
- ABCA1.....	11
- ABCG1.....	15
- SR-B1 .....	16
<i>Secondo e terzo step del trasporto inverso del colesterolo</i> .....	18
<i>Apolipoproteina E: struttura e funzione</i> .....	222
<i>Ruolo del polimorfismo dell'apoE nelle malattie cardiovascolari</i> .....	26
<i>Il polimorfismo dell'ApoE e il suo ruolo vitale nel sistema neurologico</i> .....	29
<i>Patofisiologia della deficienza dell'ApoE nei topi</i> .....	33
<i>L'apoE e l'RCT</i> .....	36
<i>ACAT: struttura, funzione e distribuzione tissutale</i> .....	38
<i>Sistema Renina–Angiotensina e Aterosclerosi</i> .....	44
<i>Antagonisti dei canali del calcio</i> .....	50
<i>Inibitori dell'enzima di conversione dell'Angiotensina (ACE)</i> .....	52
<i>Mandipina &amp; Delapril</i> .....	54
- Proprietà farmacodinamiche .....	54
- Proprietà farmacocinetiche .....	55
- Associazione manidipina-delapril .....	56
<i>Scopo della ricerca</i> .....	59
<i>Scopo 1: studio ApoE</i> .....	60
<i>Scopo 2: studio ACAT2</i> .....	61
<i>Scopo 3: studio manidipina/delapril</i> .....	62
<i>Materiali e metodi</i> .....	63
<i>Studio sull'apoE macrofagica e sistemica</i> .....	64
<i>Animali</i> .....	64
<i>RCT macrofagico in vivo</i> .....	64

<i>Analisi lipidiche</i> .....	65
<i>Valutazione dell'efflusso lipidico</i> .....	65
<i>Valutazione del potenziale di efflusso delle HDL</i> .....	66
<i>Elettroforesi bidimensionale su gel</i> .....	66
<i>Determinazione del colesterolo intracellulare</i> .....	66
<i>Determinazione del contenuto proteico</i> .....	67
<i>Analisi statistica dei dati</i> .....	68
Studio ACAT2 .....	68
<i>Animali</i> .....	68
<i>Oligonucleotidi antisenso (ASO)</i> .....	69
<i>Studio sul potenziale di efflusso a sieri</i> .....	69
- Quantificazione dell'efflusso cellulare di colesterolo mediato da diffusione passiva e dalla proteina ABCA1 .....	69
- Quantificazione dell'efflusso di colesterolo mediato da SR-B1 .....	70
<i>Analisi statistica dei dati</i> .....	70
Studio manidipina/delapril .....	71
<i>Animali</i> .....	71
<i>Valutazione della lesione aterosclerotica</i> .....	71
<i>Accumulo di colesterolo nell'aorta</i> .....	72
<i>Valutazione immunoistochimica delle molecole di adesione</i> .....	72
<i>Quantificazione dei livelli plasmatici di interleuchina-6</i> .....	72
<i>Analisi statistica dei dati</i> .....	73
Risultati .....	74
Ruolo dell'apoE sull'RCT macrofagico in vivo .....	75
Valutazione del ruolo dell'apoE sull'efflusso di colesterolo nel macrofago .....	76
Ruolo della delezione dell'apoE sistemica nell'RCT macrofagico in vivo .....	77
Valutazione del ruolo dell'apoE sistemica nell'efflusso cellulare di colesterolo .....	78
Analisi elettroforetica della distribuzione delle HDL nel plasma di topo wild type e knockout per l'apolipoproteina E .....	80
Accumulo di colesterolo in macrofagi WT esposti a plasma WT e apoE-/- .....	81

Valutazione dell'efflusso di colesterolo sul siero di topi wild type e double knockout LXR $\alpha$ / $\beta$ dopo trattamento con ASO6.....	82
<i>Efflusso di colesterolo per diffusione passiva e mediato da ABCA1</i> .....	82
<i>Efflusso di colesterolo mediato da SR-B1</i> .....	84
Valutazione dell'accumulo dei lipidi nell'aorta e nelle valvole cardiache .....	85
Profilo lipoproteico nell'aorta toracica .....	86
Espressione di VCAM-1 nelle valvole cardiache e nell'aorta ascendente.....	87
Quantificazione plasmatica dell'interleuchina 6 (IL-6) .....	88
<i>Discussione</i> .....	89
Discussione 1: Studio ApoE .....	90
Discussione 2: Studio ACAT2 .....	93
Discussione 3: Studio manidipina/delapril.....	95
Bibliografia .....	100

# *Introduzione*

## **Aterosclerosi**

L'aterosclerosi, un disordine progressivo caratterizzato da un accumulo di lipidi e elementi fibrosi nelle grandi arterie, rappresenta una fra le prime cause di morte nei paesi industrializzati. Studi epidemiologici negli ultimi 50 anni, hanno evidenziato il coinvolgimento di numerosi fattori di rischio nel processo aterosclerotico. Questi possono essere raggruppati in due grandi categorie: fattori con una importante componente genetica e fattori ambientali.

La relativa abbondanza di differenti lipoproteine nel plasma sembra essere la principale causa come prerequisito necessario all'incremento dei livelli di lipoproteine aterogene, coinvolte nello sviluppo della malattia. Ad eccezione del sesso, e dei livelli di lipoproteine circolanti, ciascuno dei fattori di rischio di origine genetica implica la presenza attiva di vari geni. Questa complessità può essere chiaramente osservata in incroci genetici negli animali mantenuti nelle stesse condizioni ambientali; così come studi su roditori hanno rilevato dozzine di loci genetici che contribuiscono alla variazione dei livelli di lipoproteine circolanti, alla distribuzione del tessuto adiposo e altri fattori di rischio della malattia.

Un altro livello di complessità consiste nell'interazione tra i vari fattori di rischio, ad esempio gli effetti dell'ipertensione sullo sviluppo di malattie coronariche sono amplificati in maniera considerevole se presenti alti livelli di colesterolo nel plasma. L'importanza di fattori genetici e ambientali nelle malattie cardiovascolari è stata esaminata in molti studi di origine familiare. All'interno di una popolazione, l'ereditarietà dell'aterosclerosi si è dimostrata essere incidente per quasi il 50% dei casi. Dall'altra parte però, studi fatti su popolazioni migratorie, hanno chiaramente evidenziato il coinvolgimento di fattori ambientali più che genetici, nell'incidenza della malattia. Così le comuni forme di malattie coronariche risultano essere stimulate dalla combinazione di più fattori di rischio, di tipo

ambientale e dovuti anche alla suscettibilità genetica, oltre che da uno stile di vita poco opportuno (Lusis 2000).

## **Trasporto inverso del colesterolo**

Il concetto di “trasporto inverso del colesterolo” (RCT) è stato introdotto per la prima volta da Ross e Glomset nel 1968 per descrivere il meccanismo attraverso il quale il colesterolo extra-epatico (di origine periferica) è trasportato al fegato per poi essere escreto nella bile ed infine nelle feci (Glomset 1968) (Figura I). Il ritorno del colesterolo “periferico” al fegato è necessario per bilanciare l’*intake* e la sintesi *de novo*, in modo da mantenere costante l’omeostasi del colesterolo in tutto il corpo (Cuchel et al. 2006). Secondo quanto ipotizzato da Glomset e Ross vi è una relazione inversa tra l’RCT e l’aterosclerosi secondo cui le lesioni ateromatose hanno inizio quando emerge uno squilibrio tra l’accumulo e la rimozione del colesterolo nelle arterie in seguito ad un insulto a livello endoteliale. Qualche anno più tardi è stato suggerito che sulla base di una relazione inversa tra colesterolo HDL e malattie cardiovascolari, l’incremento dei livelli di HDL dovrebbe portare ad un relativo aumento della clearance del colesterolo dalle pareti delle arterie con conseguente beneficio nel prevenire patologie ad esso connesse (Miller et al. 1975).

Da studi sull’uomo si evince che due terzi del colesterolo presente è trasportato dalle low density lipoprotein (LDL), mentre il 20% dalle high density lipoprotein (HDL); il rimanente dalle very low density lipoprotein (VLDL). Il colesterolo è un fondamentale componente delle membrane eucariotiche ed un importante precursore degli ormoni steroidei e degli acidi biliari. È stato dimostrato che il rapporto tra colesterolo libero (FC) e fosfolipidi all’interno delle membrane cellulari è rilevante nel mantenere il giusto range di fluidità della membrana stessa. Il colesterolo è abbondante nelle membrane plasmatiche cellulari e nell’apparato di Golgi, in particolare nelle aree delle membrane plasmatiche ricche di



proteine coinvolte nella trasduzione dei vari segnali (Lange 1991). Le cellule extra-epatiche che acquistano colesterolo mediante l'uptake di lipoproteine o sintetizzandolo de novo richiedono l'intervento fisiologico dell'RCT per catabolizzarlo, perché incapaci di farlo da sé (Cuchel et al. 2006). Le cellule hanno sviluppato diversi metodi per proteggersi dalla tossicità indotta dall'accumulo di colesterolo libero; uno tra i possibili meccanismi proposti è identificato nell'attività dell'ACAT (Acyl Coenzyme A: cholesterol Acyltransferase), in particolare l'ACAT1, in grado di convertire il colesterolo libero in estere (CE), che è successivamente immagazzinato in gocce lipidiche citoplasmatiche per essere poi disponibili quando la cellula lo richiede (Rudel et al. 2005). È stato ben stabilito e dimostrato che uno dei passaggi chiave nel prevenirne l'accumulo è l'efflusso cellulare di colesterolo dal compartimento intracellulare ad accettori extracellulari, fisiologicamente rappresentati dalle HDL. Tale processo rappresenta il primo step dell'RCT, ed è anche considerato tappa limitante per l'intero meccanismo. L'RCT ha inizio a partire dai tessuti periferici, e proprio per questo motivo che viene considerato un processo "periferico". Negli ultimi anni, però, sta prendendo piede il concetto di "RCT macrofagico" poiché nelle lesioni aterosclerotiche le prime cellule in cui si verifica l'accumulo di colesterolo sono i macrofagi, e di conseguenza, ha senso concettualizzare e misurare l'RCT come fenomeno specifico del macrofago se si vuol porre l'attenzione sull'aterosclerosi. I macrofagi sono dei "fagociti professionali" che inglobano cellule morte, lipoproteine, detriti cellulari e un quantitativo di colesterolo maggiore di qualunque altra cellula, inclusi epatociti, enterociti e cellule steroidegeniche (Cuchel et al. 2006).

Il processo dell'RCT, nel suo insieme, può essere riassunto in tre principali steps:

- L'uptake del colesterolo dalle cellule a specifici accettori extracellulari, e prende il nome di efflusso cellulare di colesterolo;
- Re-uptake del colesterolo epatico attraverso l'utilizzo di recettori lipoproteici;
- Rimodellamento delle HDL.



3. diffusione acquosa. Il colesterolo è sufficientemente solubile in acqua da poter essere trasferito attraverso la membrana cellulare ad accettori extracellulari come le HDL; questo processo coinvolge il desorbimento delle molecole di colesterolo dall'interfaccia acquosa della cellula ricca in lipidi e la loro diffusione attraverso la fase acquosa, finché non collidono e vengono adsorbite da un accettore. Il processo di diffusione acquosa è passivo, dipende dal gradiente di concentrazione del colesterolo ed è di tipo bidirezionale. La velocità del processo dipende dalle dimensioni dell'accettore, infatti queste possono influire sulle collisioni con le molecole di colesterolo presenti nella fase acquosa. Particelle piccole come le ciclodestrine possono promuovere un rapido efflusso perché possono portarsi molto vicino alla membrana plasmatica mentre le particelle di dimensioni maggiori sono accettori inefficienti. La diffusione acquosa avviene in tutte le cellule ed è un meccanismo di diffusione relativamente inefficiente se confrontato a quelli sopra citati (Yancey et al. 2003);
4. diffusione mediata dall'apolipoproteina E (apoE). Sono stati proposti diversi meccanismi correlati ad un aumento dell'efflusso promosso dall'apoE prodotta dal macrofago. Un possibile meccanismo suggerisce che l'apoE appena formata arrivi alla superficie cellulare in uno stato povero in lipidi ed acquisti lipidi mentre viene trattenuta dai proteoglicani. L'apoE trattenuta sulla superficie cellulare dal legame con i proteoglicani può facilitare il desorbimento passivo dei lipidi dalla membrana plasmatica (Lin et al. 2001). Alternativamente il legame con i proteoglicani di membrana può avvicinare apoE a siti responsabili dell'efflusso di colesterolo come SR-BI o ABCA1 e promuovere l'efflusso lipidico (Takahashi et al. 1999).

- **ABCA1**

ABCA1 (Adenosine triphosphate binding cassette transporter A1) è una proteina integrale di membrana composta da 2261 amino-acidi, contenente 12 domini transmembrana con due larghe loops extracellulare altamente glicosilate ed unite da uno o più legami

cisteinici, una loop citoplasmatica contenente una regione idrofobica e due nucleotide-binding domains citoplasmatici (Oram 2002). Fa parte della famiglia delle ATP-binding cassette transporters caratterizzate da un motivo strutturale comune e dall'utilizzo di ATP come sorgente di energia per il trasporto di diversi substrati. Essa è coinvolta nel trasporto di una serie di piccole molecole, ioni, lipidi e citotossine e la sua assenza può portare a patologie come fibrosi cistica, retinite pigmentosa e colestasi intraepatica familiare (Yancey et al. 2003). L'ABCA1 fu scoperta nel 1999 a seguito di studi su pazienti affetti dalla malattia di Tangier, una rara patologia che conduce ad una diminuzione delle HDL plasmatiche, all'accumulo di foam cell macrofagiche in diversi tessuti, a neuropatia periferica e ad un moderato aumento dell'aterosclerosi (Tall 2008). Nel stesso anno sono state identificate mutazioni geniche per ABCA1 in pazienti con malattia di Tangier e da qui è stato proposto che la proteina controllasse il trasferimento di colesterolo e fosfolipidi ad apoAI, stadio iniziale nella formazione delle HDL (Brooks-Wilson et al. 1999). Il mal funzionamento di ABCA1 fa sì che apoAI rimanga povera in lipidi e venga rapidamente rimossa ed eliminata dai reni, prevenendo la formazione delle HDL (Knight 2004). A supporto di tale tesi si è visto che macrofagi privi di ABCA1 manifestavano una marcata riduzione dell'efflusso di colesterolo ad apoAI in vitro. In studi in vivo si è visto che topi riceventi bone marrow da topi knockout per ABCA1 presentavano un aumento dello sviluppo delle lesioni aterosclerotiche, pur avendo normale concentrazione di colesterolo HDL plasmatiche, mentre topi riceventi bone marrow da topi con una iper-espressione della proteina ABCA1 presentavano una riduzione dell'aterosclerosi (Van Eck et al. 2006).

Diversi meccanismi proposti per delucidare l'efflusso ad apoAI mediato da ABCA1 nei macrofagi. Il primo consiste in una interazione diretta tra il trasportatore e le apolipoproteine, e il secondo propone la formazione di un complesso tra apoAI con i fosfolipidi ed il colesterolo alla superficie cellulare in un processo promosso da ABCA1. Nel primo meccanismo si propone un legame diretto tra apoAI e ABCA1 a livello della superficie cellulare e la successiva internalizzazione in endosoma dove apoAI viene lipidata e successivamente risecreta dalla cellula mediante esocitosi (Takahashi et al. 1999). Il

secondo modello è supportato da dati che mostrano come un'attività ATPasica è necessaria per il legame di apoAI alla superficie cellulare e come l'espressione di ABCA1 cambi la morfologia della membrana con un incremento nelle quantità di colesterolo e fosfolipidi sulla parete esterna della membrana plasmatica (Yancey et al. 2003). Studi recenti hanno mostrato che mutazioni nell'elica 10 dell'apoAI riducono l'efflusso ABCA1 mediato e che le stesse varianti di apoAI lipidate sono positivamente correlate con un efflusso mediato da ABCA1. Questi dati suggeriscono come un'interazione di apoAI con il dominio lipidico e ABCA1 sia richiesta per l'efflusso. È stato quindi proposto un modello in cui l'elica 10 di apoAI inizialmente interagisce con il dominio lipidico associato ad ABCA1 e successivamente fluisce lateralmente nella membrana per formare un legame produttivo con ABCA1. Tutto ciò porta alla lipidazione dell'apolipoproteina per la formazione delle HDL (Panagotopoulos et al. 2002).

L'espressione macrofagica di ABCA1 così come di ABCG1 è regolata a livello trascrizionale da recettori nucleari quali LXR $\alpha$  e LXR $\beta$  (liver X receptor) che agiscono come eterodimeri con recettore RXR (retinoid X receptor). I ligandi endogeni per LXR sono ossisteroli generati dall'azione enzimatica intracellulare sul colesterolo. In questo modo l'accumulo di colesterolo intracellulare promuove la formazione di ossisteroli che attraverso l'azione su LXR promuovono un aumento nell'espressione di ABCA1 e ABCG1 e di conseguenza di efflusso di colesterolo sia ad apoAI che ad HDL. Agonisti del peroxisome proliferator-activated receptor, in particolare il recettore PPAR- $\alpha$  e PPAR $\gamma$ , promuovono l'efflusso macrofagico in vitro attraverso un aumento nell'espressione di ABCA1, sembra attraverso un upregulation di LXR (Chinetti et al. 2001). La regolazione a livello trascrizionale di ABCA1 è anche promossa da fattori indipendenti al sistema LXR/RXR, come l'adenosina monofosfato ciclico (cAMP), che insieme ad inibitori della fosfodiesterasi 4, stimola la trascrizione genica di ABCA1 (Oram 2002). Il cAMP in seguito all'attivazione della proteina chinasi A (PKA) porta alla fosforilazione della CRE-binding protein (CREB1), che si lega alla sequenza CRE (cAMP response element) localizzata sul primo introne del gene per ABCA1 nel topo ed induce la trascrizione di ABCA1. L'attivazione trascrizionale di ABCA1

promossa da CRE avviene in cooperazione con il vicino sito di regolazione STAT, localizzato a 81 paia di basi da CRE. L'assenza di un sito CRE funzionale negli uomini, nonostante la presenza della sequenza STAT, potrebbe spiegare perché il cAMP non è in grado di stimolare la trascrizione di ABCA1 in questi (Le Goff et al. 2006). La regolazione post-trascrizionale di ABCA1 è promossa dal legame con apoA1 o apoE, che stabilizza il recettore dalla degradazione calpaina mediata. Recentemente, è stato dimostrato che ABCA1 contiene una sequenza chiamata PEST (ricca in prolina, acido glutammico, serina e treonina) richiesta per la proteolisi calpaina mediata del trasportatore (Knight 2004). La rimozione di tale sequenza porta da un lato ad un accumulo di ABCA1 a livello della membrana plasmatica, ma dall'altro favorisce una riduzione della sua concentrazione a livello endosomiale, dove promuove l'efflusso di colesterolo accumulato dopo l'uptake di forme modificate di LDL. Questo risulta in un aumento dell'efflusso di colesterolo dalle cellule dopo l'arricchimento della membrana plasmatica con ciclodestrina e colesterolo, e ad una riduzione dell'efflusso di colesterolo dagli endosomi ricchi in LDL modificate (Tall 2008).

L'attività di ABCA1 può essere inoltre modulata attraverso l'uso di composti di sintesi come il probucolo, composto lipofilo dotato di proprietà antiossidanti, scoperto nel 1970 (Davignon 1986), capace di agire come inibitore della proteina. Diversi sono i lavori in cui si evince che il probucolo è in grado di contrastare per l'80% l'efflusso di colesterolo in macrofagi esprimenti il suddetto trasportatore, mentre non ha alcuna inibizione su fibroblasti con mutazione di Tangier e su cellule esprimenti un diverso trasportatore come SR-BI (Favari et al. 2004). Il probucolo esercita il suo effetto inibitorio attraverso diversi meccanismi, e la rapidità con cui agisce fa escludere una sua possibile azione a livello dell'espressione di ABCA1 o della sua degradazione. È stato invece riportato che il probucolo riduce il legame specifico di apoA1 alla membrana plasmatica in cellule trattate con cAMP quando confrontate con cellule controllo (Tsujita et al. 1996). Lo stesso effetto inibitorio del probucolo sul legame di apoA1 è stato riportato anche in fibroblasti umani WI-38. ABCA1 risiede sia a livello della membrana cellulare che in vescicole intracellulari e

si sposta attraverso questi due compartimenti. Benché non ci siano pareri unanimi, sembra che il trattamento con probucolo porti alla distribuzione di ABCA1 dalla membrana plasmatica alle vescicole intracellulari (Favari et al. 2004).

- **ABCG1**

ABCG1 (Adenosine triphosphate binding cassette transporter G1) è un membro della famiglia dei “mezzi” trasportatori che contiene un singolo dominio di legame nucleotidico ed un dominio transmembrana costituito da sei eliche. Per poter svolgere la loro funzione i trasportatori ABC devono avere due domini nucleotidici e per questo sono presenti come omodimeri (per esempio ABCG2) o come eterodimeri in associazione con altri “mezzi” trasportatori come ABCG5/ABCG8 (Jessup et al. 2006). A differenza di ABCA1, ABCG1 promuove l’efflusso ad HDL mature. Sembra che entrambi i trasportatori possano agire in sequenza all’interno della stessa cellula: infatti ABCA1 promuovendo l’efflusso di colesterolo e fosfolipidi ad apoAI o pre- $\beta$ 1 HDL porta alla formazione di HDL discoidali che in seguito a processi di lipidizzazione favoriscono l’efflusso ABCG1 mediato (Tall 2008).

ABCG1 è espressa prevalentemente nei macrofagi, nelle cellule endoteliali e nei linfociti. Sono state proposte diverse isoforme della proteina nei macrofagi, anche se non è ancora chiaro come queste siano espresse a livello proteico o la loro importanza funzionale (Jessup et al. 2006). Così come per ABCA1 anche per ABCG1 sono stati proposti due diversi meccanismi di efflusso del colesterolo. Il primo proposto da Small nel 2003, suggerisce che ABCG1 aiuti il passaggio delle molecole di colesterolo attraverso la membrana plasmatica forse con l’utilizzo di ATP seguito da una collisione transiente con gli accettori, in questo caso le HDL (Small 2003). Essendo però la barriera energetica tra le due facce della membrana molto bassa, sembra alquanto improbabile che ABCG1 semplicemente traslochi il colesterolo dall’interno all’esterno della membrana. In un’altra ipotesi proposta nel 2006 da Kobayashi, si ipotizza che ABCG1 possa cambiare l’organizzazione fosfolipidica della membrana, aumentando il contenuto di sfingomieline e fosfolipidi saturi, rendendola pronta nel rilasciare gli steroli e i fosfolipidi ad accettori extracellulari e facilitando la

diffusione delle molecole di colesterolo verso la faccia esterna (Kobayashi et al. 2006). È inoltre da notare come ABCG1 promuova il movimento di colesterolo dal reticolo endoplasmatico alla membrana plasmatica aumentando l'affinità della membrana plasmatica per gli steroli del reticolo endoplasmatico (Tall et al. 2008). Le stesse HDL, proteggono i macrofagi dall'apoptosi indotta dalle LDL ossidate o dal colesterolo libero, e sperimentalmente è stato notato che in macrofagi ABCG1 -/- l'effetto protettivo delle HDL veniva meno (Jessup et al. 2006). Questo risultato riflette l'abilità specifica delle HDL e di ABCG1 nel promuovere l'efflusso cellulare di steroli modificati in posizione 7 come il 7-chetocolesterolo (7-KC), metabolita derivante dall'ossidazione del colesterolo presente nei cibi trattati ed è anche l'ossisterolo più abbondante nelle LDL ossidate e nelle placche aterosclerotiche umane. Topi ABCG1-/- mostrano un accumulo del 7-chetocolesterolo nei macrofagi ed una sua riduzione nel plasma quando alimentati con una dieta ricca in colesterolo. Da qui si è affermato che ABCG1 possiede un ruolo specifico nel promuovere l'efflusso del 7-KC alle HDL<sub>2</sub> con conseguente ruolo protettivo, nelle cellule endoteliali e nei macrofagi, dagli ossisteroli consumati nella dieta o formati dalle LDL (Tall et al. 2008).

Come per ABCA1, l'espressione di ABCG1 è stimolata dal recettore LXR, un fattore di trascrizione nucleare, ma a differenza di ABCA1 l'espressione di ABCG1 non viene indotta dal cAMP nei macrofagi shJ774 (Jessup et al. 2006).

#### - **SR-B1**

SR-BI è un membro della superfamiglia CD36, possiede un ampio dominio extracellulare glicosilato composto da 408 aminoacidi, contenente 6 residui cisteinici. Il dominio extracellulare è ancorato alla membrana da due domini transmembrana N e C- terminali con una corta coda citoplasmatica (Yancey et al. 2003). È espresso nei tessuti impegnati nell'uptake selettivo di lipidi come il fegato e le ghiandole steroideogeniche nonché in molte altre cellule inclusi i macrofagi e le cellule endoteliali. SR-BI media un flusso bidirezionale di colesterolo libero tra la cellula e le HDL in cui il movimento dipende dal gradiente di concentrazione. Esso interagisce con molti accettori tra i quali ricordiamo le



HDL, le LDL, le LDL ossidate ed acetilate e piccole vescicole unilamellari (Yancey et al. 2003). Studi su topi transgenici e knockout hanno mostrato come SR-BI accelera l'internalizzazione epatica delle HDL con successiva eliminazione nella bile del colesterolo portando così ad un effetto antiaterogeno. Paradossalmente, l'effetto ateroprotettivo si è visto anche in topi sovraespressanti la proteina SR-BI a livello epatico, in cui si nota un decremento dei livelli di HDL plasmatiche (Arai et al. 1999). Questa osservazione discorda dall'affermazione di una relazione inversa tra i livelli di HDL ed il rischio cardiovascolare, ed è stata spiegata supponendo che l'espressione di SR-BI promuova la clearance del colesterolo dai macrofagi periferici alle feci, con una conseguente promozione della formazione di apoAI ed HDL. Il controllo dell'espressione di SR-BI differisce da ABCA1 e ABCG1, i quali sono fortemente influenzati dal carico di colesterolo cellulare. L'accumulo di colesterolo sopprime l'espressione di SR-BI in macrofagi murini ed umani, con un meccanismo indipendente da LXR e SREBPs (sterol regulatory element binding proteins), nonostante vi siano evidenze di un sito attivato da SREBPs nella sequenza promoter SR-BI. In contrasto, altri ricercatori riportano un aumento dell'espressione di SR-BI in macrofagi umani caricati con LDL modificate. La discrepanza dei risultati può essere dovuta al differente stadio di differenziazione dei macrofagi nello studio, la cui espressione aumenta con la differenziazione dei monociti a macrofagi (Jessup et al. 2006). Per quanto riguarda il meccanismo d'azione del recettore, è stato proposto che la sua espressione sia associata alla formazione di estensioni specializzate a livello della membrana plasmatica, siti in cui va a localizzarsi SR-BI e dove scambia lipidi con le HDL. SR-BI accelera il passaggio di colesterolo libero forse attirando in prossimità della membrana plasmatica gli accettori o inducendo cambiamenti nella distribuzione e disponibilità del colesterolo in membrana (Yancey et al. 2003).

### ***Secondo e terzo step del trasporto inverso del colesterolo***

Le HDL nascenti passano attraverso il processo di maturazione e di rimodellamento intravascolare mediante diverse reazioni metaboliche e enzimatiche. Inizialmente, la Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) catalizza il trasferimento dei gruppi 2-acyl dall'enzima al colesterolo libero, generando colesterolo estere (esempio colesterolo linoleato) e lisolecitina (Franceschini et al. 1991). Il CE, per la sua natura altamente idrofobica rispetto al FC, tende a muoversi verso il core delle particelle lipoproteiche, portando a modificazione della conformazione delle HDL. Le pre $\beta$ -HDL di forma discoidale vengono trasformate dall'attività dell'LCAT in particelle mature, di forma sferica denominate  $\alpha$ -HDL (Attie et al. 2001). L'azione di questo enzima è considerata di fondamentale importanza nel promuovere il processo di RCT, perché in grado di mantenere costante il gradiente di concentrazione delle HDL tra plasma e cellule, ma altrettanto un errore nel suo funzionamento potrebbe portare ad un incremento dell'aterosclerosi. In un recente lavoro di Rader e Rothblat, è stato dimostrato che mentre l'enzima LCAT influisce sul metabolismo delle HDL, potrebbe non avere invece un ruolo cruciale nell'RCT macrofagico (Rader et al. 2009). Nel nostro laboratorio di ricerca è stato altresì dimostrato che il siero di pazienti deficitari del suddetto enzima mostrano un capacità simile alla capacità del siero di pazienti sani, nel ridurre il contenuto di colesterolo in cellule macrofagiche caricate di colesterolo, a causa di un aumentato efflusso di colesterolo mediato dalla proteina ABCA1 (Calabresi et al. 2009). Dallo stesso lavoro si evince che la distribuzione delle particelle di colesterolo HDL è fortemente alterata in pazienti in cui l'enzima è mutato, caratterizzati da una riduzione nel contenuto delle HDL<sub>2</sub> e dall'accumulo in pre $\beta$ -HDL, responsabili queste dell'efflusso ABCA1 mediato. Inoltre, l'LCAT sembra non essere coinvolto nella deplezione del colesterolo dai macrofagi e nel processo di RCT, poiché il colesterolo può essere ricaptato dalle HDL discoidali e trasportato al fegato mediante l'azione di SR-B1.

In questa fase intravascolare dell'RCT, le  $\alpha$ -HDL sono soggette all'attività del cholesteryl ester transfer protein (CETP): glicoproteina idrofobica, secreta dal fegato e dal tessuto adiposo, che circola nel plasma legata a lipoproteine. Essa promuove il trasferimento di molecole di CE dalle HDL alle LDL, e solo quando è presente una condizione di ipercolesterolemia, alle VLDL in cambio di TG e viceversa (Franceschini et al. 1991). Le lipoproteine LDL ritornano al fegato e interagendo con gli appositi recettori (LDLr) rilasciano il CE agli epatociti. La fase finale del processo coinvolge diversi meccanismi e la maggior parte degli studi tengono conto dell'influenza del meccanismo di uptake selettivo del colesterolo HDL da parte di SR-B1 epatica. Difatti, topi knockout per SR-B1 mostrano elevati livelli di HDL nel plasma in seguito a compromesso uptake epatico (Rigotti et al. 1997), mentre la sovraespressione epatica della proteina porta ad una riduzione dei livelli plasmatici delle HDL per l'aumento dell'uptake epatico (Wang et al. 1998) (Kozarsky et al. 1997). È stato dimostrato che topi in cui tale proteina è sovra espressa a livello epatico promuovono l'RCT macrofagico nonostante una ridotta concentrazione di HDL nel plasma; al contrario la mancanza di SR-B1 riduce marcatamente l'RCT nel macrofago anche se si verifica un incremento delle HDL a livello plasmatico (Zhang et al. 2005). Un ulteriore meccanismo proposto per questa fase finale del trasporto inverso del colesterolo è l'intervento delle HDL ricche in apoE, in assenza o per scorretta funzionalità della CETP. Da quando è stato dimostrato che tale apolipoproteina è un efficiente ligando per i recettori delle LDL, si attribuisce ad essa la capacità di veicolare il CE al fegato mediante appunto l'interazione con gli LDLr (Mahley et al. 2006).

Classe eterogenea di lipoproteine caratterizzate da un elevata densità ( $>1.063\text{g/ml}$ ) e di piccole dimensioni (5-17nm), le HDL umane contengono due principali apolipoproteine: apoAI e apoAII, che rappresentano il 70 e il 20% rispettivamente, delle proteine presenti nelle HDL. Oltre a queste, si ritrovano anche se in percentuale minore altre apolipoproteine quali: apoA-IV, apoC, apoD, apoJ, apoM ed infine l'apoE (Barter 2002). Dall'azione di differenti fattori plasmatici e cellulari, le HDL sono sottoposte a continui processi di rimodellamento, che portano alla formazione di loro sottopopolazioni e

frazioni rilevabili nel sangue umano. Diversi sono anche i criteri per classificare queste sottofrazioni, in base alle varie tecniche usate per la loro separazione:

- Microscopia elettronica, utile per separare le particelle sferiche da quelle discoidali;
- Ultracentrifuga, per ottenere particelle a diverso gradiente di densità:  
 $\text{HDL}_2$  ( $1.063 < d < 1.125 \text{ g/ml}$ ) e  $\text{HDL}_3$  ( $1.125 < d < 1.121 \text{ g/ml}$ );
- Gel di poliacrilammide per individuarne la dimensione:  $\text{HDL}_{3c} < \text{HDL}_{3b} < \text{HDL}_{3a} < \text{HDL}_{2a} < \text{HDL}_{2b}$ ;
- Composizione delle apolipoproteine: apoA<sub>i</sub> e apoA<sub>II</sub>;
- Elettroforesi bidimensionale del gel di agarosio per identificare la migrazione delle particelle in posizione  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ .

Il rimodellamento e il metabolismo delle HDL consiste nel cambiamento del contenuto lipidico e delle apolipoproteine presenti, e coinvolge almeno dieci diverse proteine: ABCA1, LCAT, SR-B1, CETP, apoA<sub>I</sub>, PLTP, LPL, HL, EL e cubilina (Wang et al. 2004).

Phospholipid transfer protein (PLTP), membro della famiglia della CETP, promuove il trasferimento dei fosfolipidi (PL) dalla superficie delle VLDL e dei chilomicroni alla HDL durante la lipolisi dei trigliceridi, e tiene conto della maggior parte dei trasferimenti dei PL nel plasma umano. La proteina in questione rimodella le HDL trasformandole in pre $\beta$ -HDL e HDL più larghe mediante la fusione di più particelle tra loro, ed è capace di rilasciare apoA<sub>I</sub> (Qin et al. 2000). Topi in cui viene meno l'azione della PLTP mostrano una riduzione del 60% della concentrazione di HDL e apoA<sub>I</sub>, a causa di un incremento della clearance delle HDL (Jiang et al. 1999). È stato anche dimostrato che topi transgenici della PLTP umana hanno un aumento dei livelli in pre $\beta$ -HDL, apoA<sub>I</sub> e PL (Jiang et al. 1996).

Lipoprotein lipase (LPL) è secreta da molti tessuti del corpo, in particolare dal tessuto adiposo e dai muscoli. Essa è in grado di mediare l'idrolisi dei trigliceridi, trasformando grandi particelle ricche in TG (quali VLDL e chilomicroni) in piccole lipoproteine deplete

degli stessi. Lipidi superficiali che fungono di riserva (FC e PL) e apolipoproteine vengono successivamente trasferite dai chilomicroni alle HDL, incrementando così i livelli plasmatici di colesterolo HDL e apoAI (Wang et al. 2004).

Come le LPL, anche l'Hepatic Lipase (HL) e Endothelial Lipase (EL) appartengono alla famiglia delle lipasi dei TG (Wang et al. 2004). L'HL è sintetizzata dagli epatociti, capace di convertire le HDL<sub>2</sub> in particelle più piccole come HDL<sub>3</sub> lipid poor/lipid free apoAI, mediante l'idrolisi dei trigliceridi. Le HDL così modificate possono legarsi ad un recettore putativo nel fegato che media la loro internalizzazione e degradazione (Lewis et al. 2005). Endothelial Lipase (EL) fu scoperta nel 1999 e ha un'omologia del 40% con HL. È sintetizzata dalle cellule endoteliali, fegato, polmoni e reni ed è dotata di un'alta attività fosfolipasica, mentre è bassa la sua attività riguardante la lipolisi dei TG, se confrontata a LPL e HL (Rader et al. 2000).

Livelli di apoAI nel plasma sono strettamente correlati ai livelli di HDL. Vari sono gli studi che attestano che bassi livelli di apoAI possono essere considerati fattori di rischio per eventi cardiovascolari o aterosclerotici (Walldius et al. 2006). I due principali organi deputati alla sintesi di HDL nascenti, come lipid poor/lipid free apoAI o piccole particelle contenenti apoAI e fosfolipidi, sono il fegato e l'intestino. Queste particelle acquistano colesterolo e fosfolipidi mediante l'azione di ABCA1, formando così le pre $\beta$ -HDL. Il fegato è il principale modulatore dell'omeostasi del colesterolo nel corpo umano ed anche il maggior sito di sintesi delle apoAI, e l'idea che tale organo possa avere un ruolo centrale nella sintesi delle HDL, è supportato dal fatto che topi deficitari dell'ABCA1 epatica mostrano un decremento dell'95% di colesterolo HDL, mentre in topi in cui l'ABCA1 è mal funzionante i livelli di HDL sono ridotti dell'80% (Timmins et al. 2005).

## **Apolipoproteina E: struttura e funzione**

Come precedentemente accennato, l'aterosclerosi è una lenta e progressiva malattia che ha inizio nell'infanzia ma che si manifesta clinicamente non prima dell'adolescenza o nella fase adulta. Diversi sono gli studi meccanicistici svolti sull'uomo allo scopo di individuare ciò che è alla base della malattia. Mediante le recenti tecniche di individuazione genica sono stati creati diversi modelli animali che se utilizzati in maniera opportuna possono dare una gran quantità di informazioni sull'eziopatologia di questo complesso disordine.

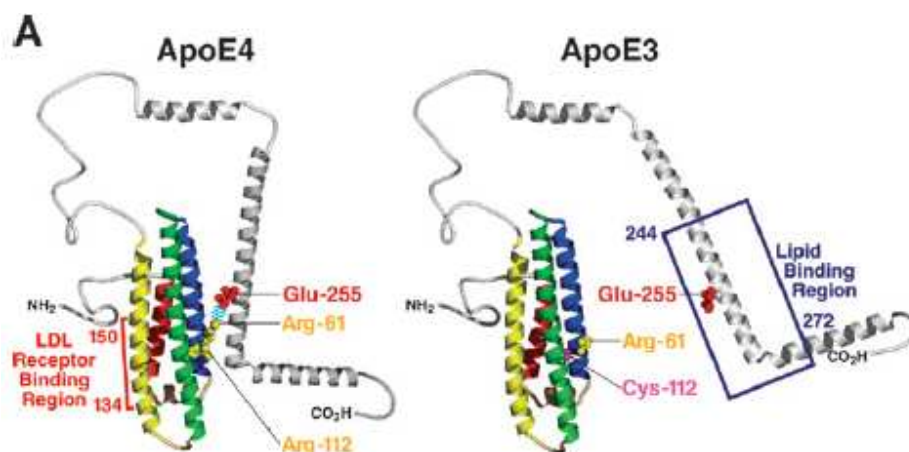
L'apolipoproteina E (apoE) è ben conosciuta per il ruolo che riveste nel trasporto del colesterolo e di altri lipidi tra i tessuti periferici e il fegato (Jawien 2008). È una glicoproteina plasmatica, scoperta nel 1970 e costituita da 299 aminoacidi, trovata nei chilomicroni remnant e in diverse lipoproteine: lipoproteine a bassa densità, VLDL; lipoproteine a densità intermedia, IDL (intermediate density lipoprotein) e nelle lipoproteine ad alta densità, HDL. L'apoE funge da ligando per i recettori cellulari di tali lipoproteine. Il suo ruolo di rilievo nella patologia aterosclerotica è stato stabilito attraverso la genetica molecolare.

Il gene dell'apoE è localizzato sul cromosoma 19 e consiste di quattro esoni e tre introni comprendenti 3.597 nucleotidi. È stato stabilito che tale proteina glicosilata pesa 35 chilodalton (kD) e viene prodotta principalmente nel fegato, ma vi sono altri organi e tessuti in grado di sintetizzare l'apoE quali cervello, reni, polmoni, gonadi, ghiandole surrenali e macrofagi (Anoop et al.), (Getz et al. 2009). Strutturalmente l'apoE è costituita da 2 domini separati da una cosiddetta "regione cerniera" (Mahley et al. 2009).

È stato inoltre stabilito che il dominio N-terminale dell'apoE (i cui residui amminoacidici sono: 1-191) contiene i siti di legame per i recettori delle LDL ed anche un sito di legame per i proteoglicani eparin solfati (HSPG), ed entrambi sembrano essere collocati sugli amminoacidi 134-150 e l'Arginina (Arg) 172, dominio questo in grado di formare una loop a quattro eliche antiparallele. Il dominio C-terminale comprendente gli amminoacidi 225-

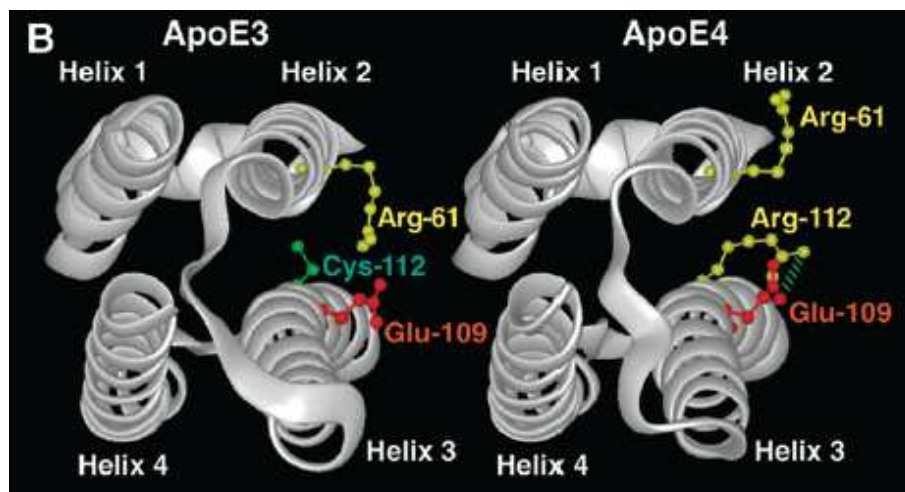
299, appare essere il diretto responsabile del legame iniziale dell'apolipoproteina ai lipidi, sugli amminoacidi 244-272 (Getz et al. 2009; Mahley et al. 2009) (Figura II).

Esistono tre isoforme codificate dal gene presente sul cromosoma 19: apoE2, apoE3 e apoE4, le quali si differenziano per le loro attività biologiche. Altrettanti sono il numero di mutazioni alleliche presenti che differiscono in frequenza:  $\epsilon 2$  (5-10%),  $\epsilon 3$  (65-70%) ed  $\epsilon 4$  (15-20%), in grado di dar luogo a tre fenotipi omozigoti e tre eterozigoti (Mahley et al. 2009).



**Figura II. Modello del dominio di interazione dell'apoE.** Mahley R.W. et al *J. Lipid Res.* 2009;50:S183-88.

A tal proposito Gladstone e il suo gruppo di ricerca fu il primo a mettere in luce le basi strutturali del polimorfismo dell'apoE, dimostrando che le isoforme differiscono solo per la sostituzione di un singolo amminoacido su due siti: residuo 112 e 158, una Cisteina (Cys) ed una Arginina (Arg), rispettivamente. L'apoE3 ha una Cys-112 e una Arg-158, mentre l'isoforma E4 possiede due Arg e la E2 due Cys.



**Figura III. Strutture tridimensionali dei domini delle diverse isoforme dell'apoE.**  
*Mahley R.W. et al J. Lipid Res. 2009;50:S183-88.*

Il ruolo ateroprotettivo dell'apoE è attribuibile a tre differenti meccanismi d'azione che includono:

- Regolazione dell'omeostasi del colesterolo plasmatico, attraverso un'efficiente uptake epatico delle lipoproteine remnant;
- La facilitazione dell'efflusso cellulare di colesterolo dai macrofagi diventati foam cells all'interno della parete dell'intima;
- La regolazione dell'infiammazione immune mediata dai macrofagi e da linfociti T, che contribuiscono a questo stato di infiammazione cronica (Curtiss 2000).

L' apoE plasmatica (~40-70µg/ml) deriva principalmente dalla sintesi epatica (>75%). Il secondo più importante sito di sintesi è il cervello. Gli astrociti producono gran parte del liquido cerebrospinale contenente apoE (~3-5µg/ml), i neuroni sintetizzano tale proteine solo se sottoposti ad una situazione di stress. Anche i macrofagi ed altri tipi cellulari sono capaci di produrre tale lipoproteina (Mahley et al. 2009).

L'apoE viaggia nel plasma catabolizzata parzialmente dalle lipoproteine remnant che trasportano colesterolo derivante dalla dieta sottoforma di chilomicroni, e colesterolo



derivante dal fegato, quale le VLDL. Le lipoproteine giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo di malattie cardiovascolari nell'uomo e i livelli di lipoproteine nel plasma sono determinati da apolipoproteine presenti sulla loro interfaccia. È stato stimato che il 60% della variazione dei livelli di colesterolo plasmatici è determinata geneticamente, mentre il 14% è dovuta al polimorfismo dell'apoE (Anoop et al.).

Il principale ruolo dell'apoE è quello di trasportare e veicolare i lipidi da un tessuto o cellula ad un altro. L'apoE è una componente delle VLDL e secreta dal fegato per poi essere acquisita dai chilomicroni, subito dopo la loro sintesi e secrezione avvenuta nell'intestino prossimale (l'unico tessuto in cui questa apolipoproteina non è sintetizzata) (Mahley et al. 2000). Le lipoproteine si arricchiscono in apoE, circolano attraverso i capillari e sono soggette a lipolisi sulla superficie delle cellule endoteliali mediante l'azione di proteine lipasi, che idrolizzano i trigliceridi, rilasciando acidi grassi necessari a fornire energia alle cellule. In questo modo, l'apoE dirige sia il metabolismo dei TG endogeni e del colesterolo (quale VLDL) sia quello dei TG e colesterolo introdotti con la dieta mediante il trasferimento degli stessi a cellule extraepatiche (via VLDL e remnant) oppure al fegato (via chilomicroni remnant), dove gli acidi grassi assunti in maniera esogena vengono metabolizzati o risecreti come TG e dove il colesterolo può essere eliminato attraverso la bile (Mahley et al. 2000). A tal proposito, la funzione dell'apolipoproteina E viene considerata simile a quella di una cellula "endocrina". Essa può ridistribuire i lipidi che sono contenuti all'interno di un tessuto tra le varie cellule e può così funzionare da cellula "paracrina".

Tali funzioni sono svolte dall'apoE mediante l'azione di due diversi tipi di recettori: i recettori per le LDL (LDLr), presenti su cellule epatiche ed extraepatiche, e la proteina legata al recettore HSPG/LDL (LRP).

L'apoE ha un'alta affinità di legame verso i LDLr, ne è in grado di regolarne i livelli sia su lipoproteine in cui essa risiede (come VLDL e chilomicroni) sia dove essa è assente (LDL). La LRP è una proteina di grandi dimensioni appartenete alla famiglia dei LDLr, permette il

legame ad una moltitudine di ligandi tra cui l'apoE. La sua attività si esplica principalmente nel fegato e riguarda il metabolismo di lipoproteine remnant. Il processo si svolge in diversi steps: inizialmente la lipoproteine intrappolate nello spazio di Disse si legano alla HSPG per mezzo dell'apoE (fase di sequestro), per poi essere lisate da lipasi localizzate sulla superficie o all'interno delle lipoproteine stesse (fase di processo). Infine, esse vengono ricaptate dai LDLr e trasferite dall'HSPG alla LRP attraverso meccanismi di internalizzazione, oppure possono subire un processo di re-uptake dal complesso proteico HSPG/LRP (fase di uptake).

L'accumulo di apoE sulla superficie delle lipoproteine rallenta drasticamente la velocità di lipolisi dei trigliceridi mediata dalle lipasi. Tutte le isoforme dell'apoE sono in grado di inibire l'idrolisi dei TG, e la loro azione può dipendere dal quantitativo di apolipoproteina E presente. L'apoE, inoltre, può influenzare in modo diretto i livelli di trigliceridi e VLDL nel plasma, ed è stato dimostrato che un incremento della sintesi e secrezione di tale proteina nel fegato o un suo accumulo nel plasma, comporta un aumento della sintesi e secrezione delle VLDL. Si può affermare che l'apolipoproteina E è in grado di regolare, quindi, l'anabolismo ed il catabolismo delle lipoproteine.

### ***Ruolo del polimorfismo dell'apoE nelle malattie cardiovascolari***

Una correlazione tra il polimorfismo dell'apoE e l'aterosclerosi fu stabilita inizialmente con l'osservazione che pazienti affetti da iperlipoproteinemia di tipo III (HLP III) e pazienti con fenotipo apoE  $\epsilon$ 2/2 manifestavano premature malattie coronariche (CHD) (Anoop et al.).

I meccanismi molecolari che appaiono responsabili dell'insorgenza della patologia sembrano essere due:

- L'alterata struttura e la funzione compromessa dell'apoE2 nella regione deputata al legame recettoriale comporta un incremento dei livelli di trigliceridi e colesterolo causato da un ritardo nella clearance epatica ed intestinale delle  $\beta$ -VLDL (lipoproteine remnant), portando così all'insorgenza dell'HLP III. Il residuo

Cys-158 in tale isoforma riveste un ruolo chiave nella regione di legame dei recettori andando ad alterare l'interazione tra i ponti di legame e abbassando il potenziale positivo.

- L'incremento nel plasma dei livelli di colesterolo, LDL e apoB associati all'isoforma E4 sembrano riflettere l'influenza del residuo Arg-112. Quest'ultimo in grado di alterare la regione deputata al legame recettoriale e capace anche di cambiare il legame preferenziale da particelle HDL ricche in fosfolipidi di piccole dimensioni (apoE2 e apoE3) in grandi VLDL ricche in trigliceridi (apoE4) (Mahley et al. 2009). Questa differenza è dovuta al dominio di interazione dell'apoE4, nel quale interagiscono il dominio N- e C-terminale, portando come risultato ad una struttura molto più compatta.

L'apoE2, per le sue caratteristiche strutturali, differisce dalle altre due isoforme nel legame ai recettori per le LDL. Nell'apoE3, l'Arg-158 forma un legame con l'Asp-154; nell'apoE2 la presenza dell'amminoacido cisteina al posto dell'arginina nel sito 158, comporta la mancata formazione del legame con l'Asp-154, portando invece alla formazione di un legame tra l'Asp-154 e l'Arg-150. Questo altera la dimensione della carica positiva del dominio e distrugge il legame ai recettori delle LDL. Tale isoforma può ancora mediare la clearance lipoproteica mediante il legame ai recettori dell'HSPG. Il fenotipo omozigote dell'apoE2 è essenziale per lo sviluppo dell'iperlipoproteinemia di tipo III (detta anche disbetalipoproteinemia), disordine che ha alla base fattori di rischio genetici e ambientali come: deficienza di estrogeni, in grado di compromettere il processo lipolitico; ipotiroidismo, associato alla ridotta espressione di recettori LDL; obesità e diabete, caratterizzati da un incremento della produzione di lipoproteine. Modelli murini transgenici per questa isoforma hanno delucidato i meccanismi alla base dell'HLP III e hanno messo in luce la correlazione esistente tra l'insorgenza del disordine e la sovra espressione di lipoproteine contenenti apoB e il decremento dei recettori per le LDL (Mahley et al. 2009).

La disposizione delle  $\alpha$  eliche proprie del dominio C-terminale dell'apoE sono responsabili del legame dei lipidi per le varie apolipoproteine. Le isoforme E3 e E2, come già accennato precedentemente, si legano a piccole HDL ricche in fosfolipidi; mentre l'E4 si lega a grandi VLDL ricche in trigliceridi. A determinare tutto ciò sono le differenti interazione tra i due domini (Figura III). Attraverso analisi cristallografiche a raggi X dell'apoE3 e E4 è stato possibile notare che: nell'apoE4, l'Arg-112 forma un legame con Glu-109 così che la catena laterale dell'Arg-61 si estende al di fuori del fascio delle quattro eliche; nell'apoE3, la catena laterale è nascosta dalla Cys-112 al posto dell'Arg. Nell'apoE4 l'orientazione dell'Arg-61 promuove l'interazione con il Glu-225 nella regione di legami dei lipidi, portando così ad una conformazione più stabile dell'apoE3. Mutazioni dell'Arg-61 con un residuo di treonina (Thr) o del Glu-225 con una alanina (Ala) aboliscono le interazioni del dominio, causando una similitudine dell'apoE4 all'isoforma E3. L'apoE4 incrementa le concentrazioni plasmatiche di LDL e il rischio di aterosclerosi ed è overespressa nei pazienti iperlipidemici e con malattie cardiovascolari (Mahley et al. 2009).

L'allele apoE e4 è stato associato ad un incrementato rischio di disturbi cardiovascolari come infarto del miocardio, ipertensione e malattie cardiache. Lehtinen e il suo gruppo, nel loro studio su pazienti che clinicamente mostravano disordini coronarici, hanno osservato un aumento plasmatico del colesterolo totale e LDL in accordo con i caratteri fenotipici dell'apoE, in ordine apoE  $\epsilon 3/2 < \epsilon 3/3 < \epsilon 3/4 < \epsilon 4/4$ , suggerendo così che l'allele e4 influenza i livelli di colesterolo totale e LDL nel plasma, e quindi il potenziale sviluppo di severe malattie cardiovascolari (Lehtinen et al. 1995).

Uno studio svolto negli Stati Uniti, il CARDIA study su americani bianchi e di colore, ha suggerito che il fenotipo apoE potrebbe essere un fattore di rischio per malattie cardiovascolari (CVD), per entrambe le popolazioni e che l'associazione tra tali malattie e l'allele e4 era molto più frequente comparato alla stessa frequenza di correlazione trovata nei pazienti controllo (Howard, 1998). Altri studi hanno correlato la presenza dell'allele e4 con un maggior rischio di malattie coronariche (CAD) e infarto del miocardio. In studi caso-

controllo, la frequenza di omozigoti per tale allele in uomini con età inferiore ai 40 anni che clinicamente manifestavano angioplastica coronarica, era superiore rispetto a quella riscontrata in soggetti sani (Anoop et al.).

Song e i suoi collaboratori nel 2004 hanno condotto una meta-analisi di 48 studi sui genotipi dell'apoE e il rischio per malattie cardiache, e hanno trovato che i portatori dell'allele apoE  $\epsilon 4$  presentano un più alto rischio per l'insorgenza delle suddette malattie dei soggetti portatori del genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 3$ . Al contrario, non sono state osservate associazioni tra l'allele  $\epsilon 2$  e i disordini sopracitati (Song et al. 2004).

Diversi studi hanno dimostrato il ruolo del polimorfismo di questa proteina nei disordini cerebrovascolari e cardiovascolari. È stato dimostrato, inoltre, come tra le varie isoforme dell'apoE ci possa essere una correlazione tra le variazioni plasmatiche di colesterolo totale e LDL e l'esistenza dell'allele  $\epsilon 4$ . L'apolipoproteina E sembra essere coinvolta in significative interazioni genetiche in grado di modulare la sua azione nei confronti dei parametri lipidici nel plasma, così come dei rischi di disordini cardiovascolari. Nonostante ciò, il duplice ruolo dell'apoE rimane ancora enigmatico e c'è la necessità di chiarire la sua precisa azione a livello delle malattie cerebrovascolari e cardiovascolari (Anoop et al.).

### ***Il polimorfismo dell'ApoE e il suo ruolo vitale nel sistema neurologico***

Originariamente identificata per la sua azione a livello del metabolismo del colesterolo, l'apoE appare di fondamentale importanza nelle malattie neurologiche umane (Anoop et al.).

Il compito di questa lipoproteina nel modificare la suscettibilità allo sviluppo della malattia di Alzheimer, ha suscitato l'interesse riveste del suo ruolo nei disordini di tipo neurologico. Diversi sono gli studi che indicano come l'apoE possa essere coinvolta nella regolazione dell'omeostasi del calcio, e perciò del suo ruolo nella regolazione di diversi recettori iono-indipendenti, inclusi gli antiporters del potassio. Di fatto l'apoE ha un'azione

fondamentale nella modulazione del rilascio/sequestro dei neurotrasmettitori, inclusi l'aumento dell'uptake del glutammato e la prevenzione da un eccesso di tossicità da esso generato.

L'apoE può anche salvare i neuroni da stress ossidativo, fenomeno questo che potrebbe dare vita all'insorgenza di neurite. È interessante notare che l'isoforma apoE3 riveste un'azione protettiva nei confronti dello stress ossidativo, rispetto all'isoforma E2 o E4. Questi risultati possono essere indotti dall'abilità dell'apoE di legare alcuni tipi di metalli, come ad esempio il ferro, oppure possono essere dovuti all'attivazione di alcune cellule, come gli astrociti, da parte dell'apoE. Altri studi hanno dimostrato come l'apoE sia in grado di aumentare alcuni fattori di crescita quali il CNTF, ciliary neurotrophic factors. In seguito a lesioni neuronali, l'espressione dell'apoE3, rispetto all'isoforma E2 o E4, è upregolata sia in vitro che in vivo, portando così all'insorgenza di neurite. Queste differenze possono essere dovute alle differenti abilità che le varie isoforme hanno nel trasportare i lipidi, nel legarsi ai recettori, o nell'influenzare diverse funzioni cellulari come ad esempio, l'omeostasi del colesterolo. La più sorprendente funzione dell'apolipoproteina E nel cervello sembra essere il suo ruolo nel regolare la risposta immune innata e adattiva (Anoop et al.). Primi studi mostrano un ruolo dell'apoE nell'inibire la proliferazione di neutrofili e linfociti, come l'attivazione delle cellule T.

La produzione dell'apoE è regolata da citochine, indicando come tale proteina possa avere un ruolo nel controllare i segnali indotti da citochine, mediante meccanismi di feedback negativi. È stato mostrato come la secrezione di questa proteina da parte di astrociti e microglia viene alterata nel cervello in seguito al trattamento con vari stimoli infiammatori, mentre il pre-trattamento con apoE porta ad una riduzione dei segnali infiammatori nelle cellule neuronali.

Nel sistema nervoso centrale (CNS), le lipoproteine hanno una densità simile a quella delle HDL, costituite da un core lipidico e colesterolo esterificato (Martins et al. 2009). Le

principali lipoproteine trovate nel liquido cerebro spinale (CSF) all'interno del CNS sono l'apoE e l'apoA1 .

Nel CNS, l'apoE è prodotta principalmente dagli astrociti gliali e in minor parte dalle microglia, la cui sintesi è up-regolata in risposta ad una lesione al sistema nervoso. Infatti, l'espressione coordinata dell'apoE e della famiglia dei recettori delle LDL sembra regolare il trasporto del colesterolo e dei fosfolipidi durante le prime fasi di riparazione delle cellule nervose nel cervello umano, in seguito a lesioni o forme di neurodegenerazione (Poirier 2000). La regolazione dell'apoE e dei recettori delle LDL facilita l'uptake del colesterolo dalle cellule, e può anche ridurre o interrompere l'attività dell'enzima 3,3-idrossimetilglutaril-Coenzima A riduttasi (HMG CoA), enzima limitante la tappa della sintesi del colesterolo.

È stato dimostrato come l'eredità dell'allele e4 sia un fattore di rischio per lo sviluppo ad esordio tardivo familiare e sporadico della malattia di Alzheimer (AD, Alzheimer's Disease), mentre l'allele e2 sembra rivestire un ruolo protettivo nei confronti della stessa malattia (Martins et al. 2009).

La malattia di Alzheimer viene classificata come un disordine progressivo e neurodegenerativo. Essa è la forma più comune di demenza, di fatti il 50-70% di tutti i casi di demenza sono clinicamente diagnosticati come AD. Tale disordine è suddiviso in due gruppi, ad esordio precoce, che si verifica prima dei 65 anni di età, ed ad esordio tardivo detto LOAD, che si manifesta dopo i 65 anni di età. L'esordio precoce dell'AD è la forma più severa della malattia, con la maggior parte dei casi dovuta a mutazioni in uno dei tre geni quali, la proteina precursore dell'amiloide (amyloid precursor protein APP), la presenilina 1 e 2 (presenilin , PS1 e PS2). L'esordio tardivo, LOAD, rappresenta la vasta maggioranza dei casi di AD, quasi il 95%. L'età è il principale fattore di rischio per il LOAD, ed è stato ormai stabilito che l'apoE ε4 è il fattore che incide per 60-80% nei pazienti affetti da tale disturbo. Individui portatori di tale allele manifestano anche un incremento

dello sviluppo dell'ipertensione, dell'ipercolesterolemia e di malattie coronariche (CAD) (Martins et al. 2009).

Pazienti con AD hanno un profilo lipoproteico simile a quello trovato nei pazienti affetti da aterosclerosi: un aumento dei livelli plasmatici di colesterolo totale e LDL, ed una riduzione del contenuto di HDL confrontati con pazienti controllo aventi la stessa età anagrafica. Un ulteriore fattore di rischio per le malattie di aterosclerosi coronarica è una riduzione dei livelli di apolipoproteina AI, ed è stato dimostrato anche in pazienti affetti da AD il contenuto di apoAI è di molto inferiore rispetto ad una situazione controllo (Merched et al. 2000). Altri fattori di rischio per le malattie cardiovascolari come l'ipertensione, l'obesità e il diabete mellito di tipo II sono stati correlati ad un incremento nell'insorgenza della malattia di Alzheimer, e di recente studi epidemiologici hanno trovato che demenza vascolare e AD sono in grado di contribuire all'insorgenza di fattori di rischio inclusi, l'ipertensione, il diabete e ad un alta concentrazione di colesterolo nel plasma. Tutti questi fattori di rischio hanno dimostrato di partecipare nella patogenesi della malattia e a loro è stato attribuito il compito di modulare i livelli di proteine chiave associate all'AD, inclusa l'amiloide  $\beta$  ( $A\beta$ ), peptide riconosciuto essere capace di aggregarsi ed accumularsi nelle placche amiloidi, principali hallmarkers neuropatologici della malattia di Alzheimer (Martins et al. 2009).

Difatti sembra che l'apoE4 interagisca con meccanismi capaci di modulare o la sintesi del peptide  $A\beta$  o la sua clearance (Mahley et al. 2009). Quando cellule neuronali esprimenti APP, vengono trattate esogenamente con tale isoforma è possibile notare un aumento della produzione dell'amiloide comparate con cellule a cui viene somministrata l'isoforma E3. Inoltre, nelle stesse cellule neuronali l'apoE E4 dato esogenamente induce destabilizzazione delle membrane e successiva morte apoptotica. È stato anche dimostrato come in posizione 61 la sostituzione dell'Arg con la Thr comporti il mancato legame di interazione tra i due domini e trasformi tale isoforme nelle caratteristiche



tipiche dell'apoE E3, fornendo così un ruolo dell'attività biologica simile a quello indotto dalla E3, ossia protettivo (Mahley et al. 2009).

### ***Patofisiologia della deficienza dell'ApoE nei topi***

Topi knockout per l'apoE, creati dalla ricombinazione omologa di cellule staminali embrionali, sono stati utilizzati nello studio di malattie aterosclerotiche nel 1994 (Nakashima et al. 1994).

Tali modelli animali sono caratterizzati da severe iperlipidemie, da una gran quantità di particelle beta delle VLDL e il loro profilo lipoproteico sembra rivestire un ruolo chiave nello sviluppo e nella progressione dell'aterogenesi (Bartelt et al.). Lo sviluppo della lesione e la composizione della placca in topi apoE è molto simile a quella che si trova negli uomini, stabilendo questi come un eccellente modello animale per lo studio della patologia dell'aterosclerosi. Un piccolo accumulo di foam cells a livello delle valvole aortiche iniziano ad apparire alla quinta settimana di vita in questi topi, e con il passare del tempo la complessità della lesione aumenta fino alla formazione del cappuccio fibroso, costituito da un core necrotico di ciò che resta delle foam cells, cristalli di colesterolo e calcificazioni. Le grandi placche allo stato avanzato sono spesso associate con l'addensamento del tessuto medio e dell'intima, accompagnate da infiammazione cronica. Le lesioni che manifestano spontanee emorragie e rottura, associate a sintomi proprio di pazienti aterosclerotici, sono osservate in studi con animali più anziani alimentati con diete ricche di colesterolo (Pendse et al. 2009).

Topi transgenici deficitarii dell'apolipoproteine E (apoE<sup>-/-</sup>) hanno mostrato alti livelli di colesterolo nel plasma, comparati questi con i livelli trovati in topi controllo (500 rispetto a 60-90 mg/dl), tutto ciò dovuto ad una ridotta clearance delle lipoproteine remnant che in genere vengono metabolizzate dal fegato. Quando poi gli stessi topi vengono alimentati con una dieta ricca in grassi, i loro livelli di colesterolo nel plasma possono aumentare fino a 2000 mg/dl e nel giro di pochi mesi sviluppare estese lesioni. Queste lesioni sono il

risultato diretto dell'accumulo plasmatico di lipoproteine remnant, incluse le VLDL e le LDL, a maggior rischio aterogenico (Jawien 2008).

Ross e i suoi collaboratori hanno dimostrato che i topi apoE<sup>-/-</sup> trattati a dieta normale mostrano livelli di colesterolo plasmatici in un range di 360-885 mg/dl con una media di 606mg/dl, rispetto a topi controllo che nelle stesse condizioni raggiungono livelli di colesterolo tra i 101-119mg/dl, con una media di 109mg/dl. I siti predisposti allo sviluppo delle lesioni ateromatose sono diversi: la base dell'aorta, la più piccola curvatura dell'arco aortico, i rami dell'arteria brachicefalica, le pareti della carotide, i rami dell'arteria mesencefalica superiore, entrambe le arterie renali, la biforcazione aortica e l'arteria polmonare (Nakashima et al. 1994). In topi trattati con dieta normale, le lesioni tendono a manifestarsi nella decima settimana di vita; con l'aumentare dell'età, le lesioni diventano sempre più grandi come dimensioni, e il loro aspetto è quello tipico di un cappuccio fibroso in grado di occludere il lume dell'arteria fino ad un 95% del volume totale. Altresì in topi mancanti dell'apolipoproteina E, trattati una dieta ricca in grassi, la lesione aterosclerotica insorge di solito nella sesta settimana di vita; i primi cambiamenti apportati a tali modelli animali sono l'adesione di cellule mononucleate alla superficie endoteliale delle pareti dell'arteria, il cui accumulo porta successivamente alla formazione delle foam cells, dando inizio allo sviluppo del cappuccio fibroso. Negli animali più anziani (dalle 20 alle 40 settimane di vita) a seconda della dieta a cui vengono sottoposti, questi presentano un placca più o meno avanzata, costituita da un grosso core necrotico, composto da cellule della muscolatura liscia, proteoglicani, depositi di lipidi e tessuto fibroso, e il conseguente distacco può indurre trombosi ed essere alla base di tutte quelle patologie correlate appunto all'aterosclerosi.

Come precedentemente detto, l'apoE, oltre a rivestire un ruolo fondamentale nello sviluppo e progressione della lesione aterosclerotica, gioca un ruolo chiave a livello del sistema nervoso centrale. Nei topi apoE knockout è stato osservato un significativo decremento dell'attività della acetil colin transferasi nell'ippocampo e nella corteccia

frontale rispetto a topi con patrimonio genetico normale, mostrando così un ridotto apprendimento e poca memoria (Anoop et al.).

Mohammed e suoi collaboratori nel 2001 hanno osservato che l'assenza dell'apoE nei topi influenza significativamente il metabolismo del colesterolo così come accade in topi in cui l'apolipoproteina è mutata o assente. Difatti topi apoE knockout presentano livelli plasmatici di colesterolo totale e trigliceridi quattro e due volte superiore comparati con topi wild-type, rispettivamente. Livelli questi che sono simili a quelli riscontrati negli uomini in cui manca tale proteina. Questi topi mostrano anche lo sviluppo di placche ateromatose e xantomi cutanei a causa di una aumentata concentrazione di colesterolo totale nel plasma, ridotti livelli di colesterolo HDL e per la presenza di piccole particelle HDL antiaterogene. Inoltre sono in grado di ridurre l'attività enzimatica dell'HMG-CoA reduttasi, incrementando del 15 % il contenuto di colesterolo (Anoop et al.).

Nel 2000 Bales e suoi colleghi hanno osservato che topi apoE knockout di 6 mesi d'età, mostrano l'assenza di depositi di amiloide nel cervello. Successive analisi di incroci fatti tra modelli animali deficitarii dell'apoE e topi transgenici sovra esprimenti il gene umano mutato della proteina precursore dell'amiloide (V717F) hanno dimostrato chiare evidenze su come tale apolipoproteina abbia un ruolo cruciale nel depositare l'amiloide e nella formazione di placche neurotiche nei topi (Anoop et al.).

David e suoi nel 2004 hanno potuto dimostrare il ruolo dell'apoE nei confronti della clearance dei corpi apoptotici presenti in topi mancanti della proteina. Lo studio ha messo in luce che la completa mancanza dell'apoE nei macrofagi attenua l'ingestione di cellule apoptodiche in vitro, senza però influenzare la generale funzione di fagocitosi. Tutto ciò porta ad un accumulo di cellule morte in un range di tessuti di topi apoE knockout in vivo, così come ad un incremento di macrofagi vivi in questi tessuti. Il tutto sembra essere dovuto ad un aumento a livello sistemico di markers infiammatori, incluso TNF $\alpha$  e fibrinogeno. Lo studio in questione enfatizza l'effetto sistemico della proteina sul reclutamento del tessuto macrofagico, indipendentemente dal reclutamento lipoproteico

e dal metabolismo lipidico, in seguito ad una inefficiente captazione delle cellule apoptodiche rimanenti (Anoop et al.).

I topi apoE<sup>-/-</sup> sono stati e continueranno ad essere utilizzati in molti studi per comprendere l'impatto che fattori di rischio di origine genetica e ambientale hanno sulla suscettibilità e resistenza dell'aterosclerosi e per valutare gli effetti di possibili mezzi terapeutici (Pendse et al. 2009).

### ***L'apoE e l'RCT***

L'ApoE, importante nel metabolismo delle HDL, gioca un ruolo determinante nel trasporto inverso del colesterolo e nell'attivazione di enzimi come HL, CETP, LCAT. Essa può indurre modificazioni nella struttura delle HDL, poiché sembra facilitare l'espansione del core lipidico nelle HDL<sub>2</sub> con CE e portare ad HDL di dimensioni maggiori e di bassa densità chiamate HDL<sub>1</sub> (specialmente negli uomini e nei roditori) o HDL<sub>C</sub>. Nelle specie esprimenti CETP gran parte del colesterolo viene trasportato al fegato mediante lipoproteine contenenti apoB che possono legarsi ai recettori per le LDL a livello epatico. Nelle specie CETP deficienti, invece, il colesterolo può essere trasportato al fegato direttamente dalle HDL ricche in apoE. Le HDL ricche in apoE possono legarsi direttamente ai recettori epatici per le LDL modificando la sequenza dell'RCT (Mahley et al. 2006). L'importanza delle HDL ricche in apoE nel processo risulta confermata dal marcato incremento di queste HDL in soggetti con CETP non funzionante o mancante a seguito di mutazioni della proteina (Yamashita et al. 1990).

Diversi studi hanno poi fatto emergere il ruolo chiave di apoE nella stimolazione dell'efflusso di colesterolo macrofagico. Il meccanismo con cui l'apoE promuove l'efflusso di colesterolo rimane tuttora non chiaro, anche se, come scritto precedentemente, il legame alla superficie cellulare mediato dai proteoglicani può avere un importante contributo. ApoE ancorata in prossimità della membrana plasmatica attraverso il legame con i proteoglicani, può facilitare il desorbimento passivo dei lipidi dalla membrana

plasmatica, un processo che potrebbe coinvolgere anche SR-BI o ABCA1 (Lin et al. 2001). In particolare il contributo di ABCA1 nel flusso di colesterolo promosso da apoE rimane incerto. Huang, per esempio, in un suo studio (Huang et al. 2001) afferma che il meccanismo di efflusso promosso da apoE è indipendente da ABCA1, mentre altri studi affermano che ABCA1 è indispensabile nell'efflusso promosso da apoE (Yancey et al. 2007). È stato proposto un possibile meccanismo di efflusso mediato da apoE in cui dapprima si è pensato possa coinvolgere la secrezione di apoE macrofagica stimolata sia dall'apoE endogena che dal legame alla superficie cellulare di apoAI circolante. Successivamente, è proposto il meccanismo secondo il quale l'apoE endogena, più efficacemente di apoAI, interagisca con ABCA1 e gli altri siti cellulari (proteoglicani) portando alla formazione di particelle ricche in colesterolo libero. E infine è mostrato come in assenza di apoE macrofagica la formazione di HDL mediata da apoAI risulta meno efficiente (Yancey et al. 2007).

Secondo altri pareri contrastanti, l'apoE endogena può aumentare l'efflusso HDL mediato migliorando le proprietà dell'accettore nel promuovere il passaggio (Mazzone et al. 1994). L'apoE macrofagica inoltre può modulare l'idrolisi del colesterolo estere e la mobilitazione del colesterolo nel macrofago (Langer et al. 2000).

## **ACAT: struttura, funzione e distribuzione tissutale**

L'Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) è una proteina integrale di membrana localizzata nel reticolo endoplasmatico (ER) in grado di catalizzare la sintesi del colesterolo estere coniugato ad una molecola di colesterolo libero (FC) e di un acido grasso acil CoA (Lee et al. 2000). Tutto ciò modifica le proprietà fisiche della molecola di colesterolo, trasformandola in un composto meno solubile nella membrana plasmatica e facilitando l'immagazzinamento del colesterolo in goccioline di lipidi citoplasmatiche sottoforma di colesterolo estere.

C'è una forte evidenza che l'enzima ACAT giochi un ruolo importante nella progressione dell'aterosclerosi. Primati non di origine umana alimentati con diete ricche in grassi e colesterolo mostrano un'alta correlazione tra l'attività epatica dell'ACAT e l'area intima dell'arteria coronarica, misura dell'estensione della patologia aterosclerotica. In isolati studi di perfusione del fegato di primati non umani, il tasso di secrezione di colesterolo estere era più elevato se correlato ad aterosclerosi dell'arteria coronarica, misura questa del donatore dell'organo, e inibitori specifici dell'enzima si sono dimostrati essere efficaci nel ridurre la velocità di secrezione del colesterolo estere e dell'apolipoproteina B (apoB). La somministrazione di un inibitore dell'ACAT, CI-976, capace di agire sull'enzima a livello epatico ed intestinale, a conigli alimentati con una dieta ipercolesterolemica, ha mostrato un decremento nella formazione di foam cells nell'aorta (Lee et al. 2000).

Circa 15 anni fa', sono stati codificati due diversi geni *Soat1* e *Soat2*, per due isoforme dell'enzima ACAT: ACAT1 e ACAT2. Ciascuna possiede un modello distinto di espressione nei diversi tessuti nelle diverse specie, topi, scimmie e specie umana (Bell et al. 2006). *Soat1* è stato identificato nel 1993 grazie alla sua abilità di complementare in modo funzionale la deficienza dell'ACAT in cellule ovariche di criceti cinesi (CHO) mutate (Chang et al. 1993). Molti anni dopo la prima descrizione degli effetti del gene ACAT1 è stato

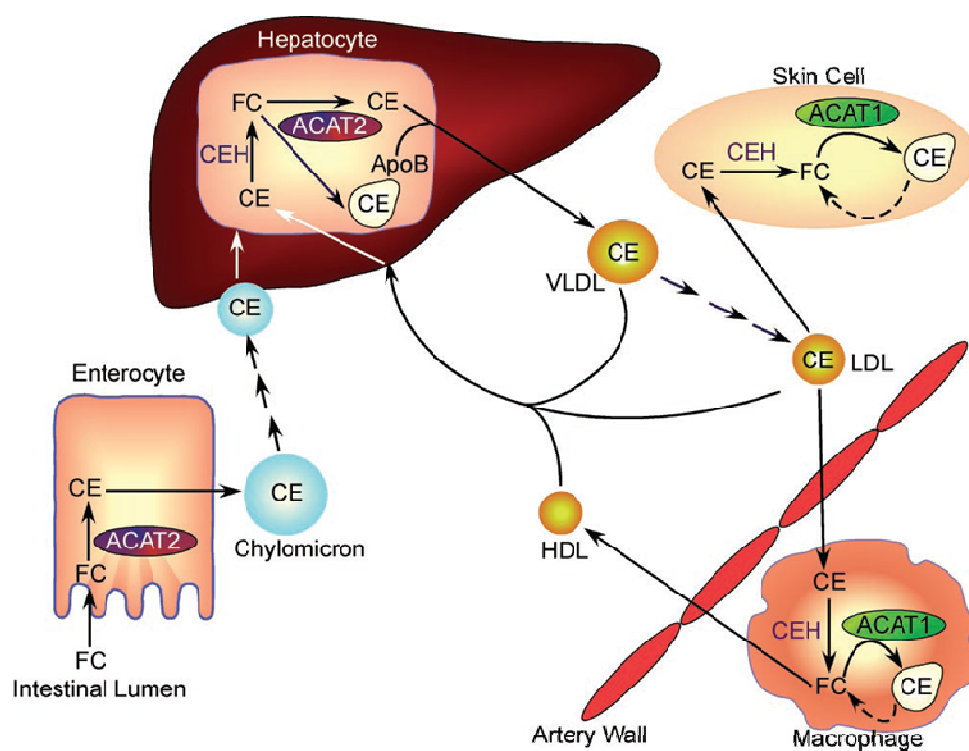
identificato il secondo enzima ACAT. Nel 1998 è stato individuato il gene *Soat2* nelle scimmie, nei topi e nell'uomo (Anderson et al. 1998).

Entrambi gli enzimi sono proteine di membrana che analizzati tramite modelli computazionali sembrano possedere 8 e 7 domini transmembrana, rispettivamente. Di questi domini, 5 hanno un dominio N-terminale residente nel citosol e il dominio C-terminale situato nel lume del reticolo endoplasmatico. La semplice mutazione del residuo di serina 269 nell'ACAT1 e 249 nell'ACAT2, serina equivalente, con la leucina comporta l'inattività degli enzimi stessi. I vari modelli topologici mostrano che il residuo di serina si trova in posizione opposta sulla membrana di ciascun enzima, suggerendo che possono esserci differenze funzionali tra di essi (Rudel et al. 2001). Questo ha permesso di dimostrare anche la loro differente distribuzione nei diversi organi e tessuti, oltre che il loro ruolo fisiologico. L'ACAT2 si trova preferenzialmente nel fegato all'interno degli epatociti e nell'intestino prossimale all'interno di enterociti, confermato da studi effettuati su primati adulti non umani e nei topi. Al contrario, epatociti ed enterociti sembrano escludere l'espressione dell'ACAT1, espressa in modo ubiquitario in molti altri tessuti. Da studi su primati non di origine umana, tale isoforma sembra essere presente in macrofagi dell'intestino prossimale, cellule di Kupffer nel fegato, cellule adrenocorticali e in cellule della capsula di Bowman e nel tubulo distale nei reni. Nei topi, questa isoforma è espressa ad alti livelli nei macrofagi, nelle cellule adrenocorticali, nelle ghiandole sebacee del derma e nelle ghiandole prepuziali (Uelmen et al. 1995) (Meiner et al. 1997).

Come negli animali, è stato dimostrato che l'ACAT1 è espresso nelle lesioni aterosclerotiche umane nei macrofagi e nelle cellule capaci di produrre ormoni, ma diversamente dagli animali, questa isoforma nell'uomo è maggiormente presente nelle cellule di Kupffer e negli epatociti (Chang et al. 2000). Nel 2004 Parini e collaboratori hanno dimostrato che come negli animali, anche nel fegato di un uomo adulto l'isoforma ACAT2 era espressa nel ER di tutti gli epatociti, mentre l'altra isoforma era confinata solo a livello delle cellule di Kupffer. I campioni analizzati in questo studio erano stati raccolti

dalla biopsia dell'organo epatico umano prelevato durante l'intervento chirurgico per eliminare calcoli biliari, e non mediante biopsia post mortem avvenuta per studi precedenti. Studi effettuati dallo stesso gruppo di ricerca, avvenuti in corrispondenza della regione 5' non tradotta dell'ACAT2 umana hanno messo in luce il fattore nucleare epatico di tipo 1 (HNF1), come il principale fattore di trascrizione di quest'enzima presente negli epatociti, delucidando il meccanismo alla base dell'espressione epatica del gene umano ACAT2 (Pramfalk et al. 2005).

I diversi studi svolti sino ad ora sulle differenze strutturali e tissutali delle due isoforme dell'enzima ACAT, hanno anche evidenziato le vari funzioni fisiologiche che esse hanno nei differenti meccanismi del metabolismo del colesterolo (Figura IV): l'ACAT1, trovata in gran quantità in quei tessuti addetti all'immagazzinamento del colesterolo estere in gocce di



**Figura IV. Struttura e funzione dell'enzima ACAT tipo 1 e tipo 2.**

*Rudel L.L. et al Curr Opin Lipidol 2001;12:121-127*



lipidi citoplasmatiche (come i macrofagi), sembra provvedere alla funzione di “pulizia” in modo da prevenire la citotossicità indotta dall’accumulo di FC. Al contrario l’ACAT2, limitata agli epatociti ed enterociti, sintetizza colesterolo estere (in particolare sottoforma di oleato e palmitato) che può essere poi incorporato o nelle cellule contenenti lipidi (da cui il FC può essere rigenerato) oppure nelle lipoproteine contenenti apoB e secreta successivamente nel plasma (Rudel et al. 2005).

In conseguenza del fatto che il FC può essere utilizzato per l’efflusso cellulare ed incorporato nelle HDL, il razionale per inibire l’attività dell’enzima ACAT era quello che alterando il bilancio intracellulare di colesterolo in favore della produzione di FC, avrebbe portato ad incrementare l’efflusso cellulare di colesterolo, l’attivazione dell’RCT e la deflazione dell’ateroma (Fazio et al. 2006). Un secondo razionale per l’utilizzo di una terapia farmacologica con ACAT inibitori era quello di ridurre la formazione di CE epatico ed intestinale, riducendo così i livelli plasmatici di lipoproteine contenenti apoB.

In esperimenti condotti su modelli animali, inibitori non selettivi dell’enzima hanno portato ad un decremento dei livelli plasmatici di colesterolo LDL e quindi alla protezione da malattie aterosclerotiche. Tutto ciò però non è stato confermato in trials sull’uomo, come l’“Avasimibe and Progression of Lesion on Ultrasound (A-Plus) study”, dove la somministrazione di inibitori non selettivi dell’ACAT, come l’*avasimibe*, a pazienti affetti da disordini coronarici non ha mostrato alcuna riduzione nel volume della placca ateromatosa. In un ulteriore studio condotto su pazienti con aterosclerosi trattati con *pactimibe* è stato possibile osservare un decremento del volume della placca, ma il trattamento farmacologico ha portato ad esacerbare il quadro patologico dei pazienti.

Successivamente, gli studi sono stati focalizzati principalmente sull’azione dell’ACAT1, per la sua presenza nei macrofagi e il suo apparente ruolo nella formazione delle foam cells all’interno della placca ateromatosa. Esperimenti condotti su topi ACAT1 knockout non hanno associato la sua mancanza ad effetti benefici sullo sviluppo dell’aterosclerosi, anzi

in molti tessuti è stato possibile osservare tossicità apparentemente legata ad accumulo intracellulare di colesterolo libero. Al contrario, topi deficitari dell'ACAT2 prodotti sul background sia di topi knockout per l'apolipoproteina E o knockout per i recettori LDL, si sono rilevati essere protettivi nei confronti della patologia senza produrre alcun segnale di tossicità. Le analisi lipoproteiche condotti su questi topi hanno mostrato una riduzione del colesterolo plasmatico senza avere un effetto determinante sulla concentrazione delle apoB nel plasma. Il decremento dell'aterosclerosi in seguito a delezione del gene per l'ACAT2 era probabilmente collegato alla funzione primaria dell'enzima nella generazione di colesterolo estere, principalmente colesterolo oleato nei chilomicroni e nelle lipoproteine nascenti (VLDL) (Bell et al. 2006). In topi double knockout per il gene dell'apoE e dell'ACAT2 è stata osservata una riduzione dei livelli di aterosclerosi aortica comparati ai livelli trovati in topi controllo knockout del solo gene apoE. Il core lipidico delle lipoproteine plasmatiche contenenti apoB nei topi double knockout era costituito principalmente da trigliceridi e un piccola concentrazione di CE. I livelli plasmatici di apoB erano rimasti invariati, suggerendo così che il quantitativo di CE derivante dall'azione di sintesi dell'ACAT2 e presente nel core era di fondamentale importanza. La protezione dall'aterosclerosi in topi knockout per l'ACAT2 è stata stabilita in animali trattati con diverse percentuali nella dieta di acidi grassi. Indipendentemente dal contenuto di acidi grassi nella dieta, i topi in questione non sviluppavano aterosclerosi (Bell et al. 2007).

Negli ultimi anni vengono utilizzati oligonucleotidi antisenso di seconda generazione (ASOs) disegnati per inibire l'isoforma 2 dell'enzima ACAT, mediante la degradazione dell'mRNA dell'ACAT2 per mezzo di un processo di degradazione promosso da Rnase-H. Gli ASOs sono composti che dovrebbero ridurre preferibilmente l'azione dell'ACAT2 epatico senza alterare la funzione dell'enzima nell'intestino o la disponibilità dell'altra isoforma presente in molti altri tessuti (Bell et al. 2006). Utilizzando questo approccio terapeutico, la deplezione dell'attività epatica dell'ACAT2 nei topi ha rivelato una via per l'escrezione fecale diversa da quella biliare (Brown et al. 2008). È ben conosciuto il ruolo aterogenico dell'ACAT2 nelle scimmie. Per molti anni, è stato riconosciuto che LDL

plasmatiche ricche in CE derivante dall'ACAT2 (sottoforma di colesterolo oleato e palmitato) si accumulasse nel plasma di questi animali, suscettibili allo sviluppo di malattie coronariche. Osservazioni fatte successivamente, durante la perfusione del fegato, hanno messo in luce che la velocità di secrezione del CE era altamente correlata all'estensione dell'aterosclerosi nell'arteria coronarica e all'arricchimento delle LDL plasmatiche in CE, indicando una diretta associazione tra l'attività epatica dell'ACAT2 e l'aterogenesi (Rudel et al. 2005). Nell'uomo, diverse pubblicazioni mostrano la correlazione tra una gran quantità di CE derivante dall'ACAT2 e un incremento delle complicazioni da CVD. Lo studio ARIC "Atherosclerosis Risk in communities" condotto su 2872 tra uomini e donne associa l'ispessimento della carotide (IMT) alla porzione di colesterolo derivante dall'isoforma in esame.

Nei laboratori della divisione di Clinical Chemistry, Dept of Laboratory Medicine Molecular Nutrition Unit, Dept for Biosciences and Nutrition presso il Karolinska Institutet di Stoccolma, sulla base del background riguardante la capacità dell'enzima ACAT2 nel fegato di esterificare il colesterolo, e quindi di come l'enzima possa essere in grado di ridurre la quantità di colesterolo libero (FC) disponibile per la secrezione di apoA1 lipid poor da parte di ABCA1, influenzando così la distribuzione e la funzionalità delle HDL plasmatiche, è stato studiato l'effetto dell'attività epatica dell'ACAT2 sulla funzionalità delle HDL nei topi. Per questo esperimento sono stati utilizzati topi wild type e LXR  $\alpha/\beta$  double knockout (LXR DOKO), alimentati con dieta di tipo occidentale, a cui sono stati iniettati per due volte a settimana (per 4 settimane) un oligonucleotide antisense mirato a ridurre l'attività epatica dell'enzima ACAT2 (ASO6; 50mg/kg/week) o un ASO non-senso. Sono stati usati topi LXR DOKO, perché andando a ridurre l'attività dell'ACAT2 aumenta la quantità di FC che si genera, in grado di indurre la stimolazione dei recettori LXR, in grado di stimolare l'enzima 7 $\alpha$ -idrolasi, enzima coinvolto nella sintesi degli acidi biliari. Bloccando i recettori LXR, viene inibita l'attività dell'enzima 7 $\alpha$ -idrolasi in modo da ottenere un modello animale in cui si ha una riduzione della sintesi degli acidi biliari. Dai risultati è stato osservato che l'ASO6 riduce i livelli di colesterolo totale ed estere (TC e CE) nel fegato, senza portare ad

alcun accumulo di FC. La down-regulation epatica dell'ACAT2 ha mostrato un forte aumento dell'espressione proteica di ABCA1 negli epatociti di topi WT e LXR DOKO. Parallelamente a questo effetto, è stato osservato un leggero aumento delle HDL-TC, seguito da un significativo incremento delle HDL-FC nel plasma (più pronunciato nei topi LXR DOKO). Grazie all'analisi bi-dimensionale su gel è stato dimostrato che nei topi WT, l'ASO6 non ha avuto alcuna influenza sulla distribuzione delle pre $\beta$ -HDL, ma ha portato alla comparsa di  $\alpha$ -particelle più grandi. Viceversa in topi LXR DOKO, la down-regulation dell'ACAT2 aumenta notevolmente il contenuto delle pre $\beta$ -HDL portando alla comparsa di piccole  $\alpha$ -HDL. Da qui l'idea che l'attività epatica dell'ACAT2 giochi un ruolo chiave nel metabolismo delle HDL nei topi. Quando l'attività epatica ACAT2 è ridotta, il FC sembra essere incanalato in modo preferenziale verso l'apoAI, in seguito ad up-regulation della proteina ABCA1. Questo sembra indurre una modificazione positiva sulla distribuzione e funzionalità delle HDL.

## **Sistema Renina–Angiotensina e Aterosclerosi**

Il sistema renina–angiotensina è uno dei maggiori sistemi regolatori della funzione cardiovascolare e renale (Schmieder et al. 2007). Questo sistema è stato considerato, per anni, come un sistema ormonale circolante in grado di regolare la pressione sanguigna, il flusso del sangue e di saper bilanciare il volume dei fluidi e degli elettroliti circolanti (Sata et al.). Il sistema renina–angiotensina è una complessa cascata enzimatico–proteica che, attraverso la generazione di mediatori cellulari, svolge un ruolo fondamentale nel controllo dell'omeostasi idrosalina, della pressione arteriosa e della crescita cellulare. Tale sistema attraverso la generazione di prodotti intermedi conduce alla formazione dell'Angiotensina II, un octapeptide che mediante il legame con recettori specifici collocati sulla membrana cellulare, con distribuzione pressoché ubiquitaria nell'organismo,

rappresenta l'effettore biologico terminale del sistema. Il sistema renina-angiotensina è intimamente collegato alla regolazione della produzione di aldosterone nella zona glomerulosa della corteccia surrenale, al punto che in endocrinologia classica il sistema viene definito nel suo complesso sistema renina-angiotensina-aldosterone (SRAA).

Elemento determinante ai fini della regolazione del SRAA è rappresentato dalla renina, enzima limitante generato dal precursore prorenina, che agisce su un substrato proteico specifico, l'angiotensinogeno, determinandone la degradazione metabolica in una serie di frammenti, tra cui in particolare un decapeptide biologicamente attivo denominato angiotensina I. Questo peptide ha un'attività biologica limitata ed è rapidamente convertito in angiotensina II dall'azione di una chinasi II, denominata enzima di conversione dell'angiotensina (ACE) a distribuzione ubiquitaria, ma particolarmente presente nell'endotelio, in grado di staccare due aminoacidi (istidina e leucina), trasformando l'angiotensina I in angiotensina II. Quest'ultima, essendo dotata di un'affinità di legame molto spiccata per i recettori, rappresenta l'effettore biologico del sistema, oltre che il principale bersaglio degli interventi terapeutici sviluppati sino ad oggi per modulare l'attività del SRAA.

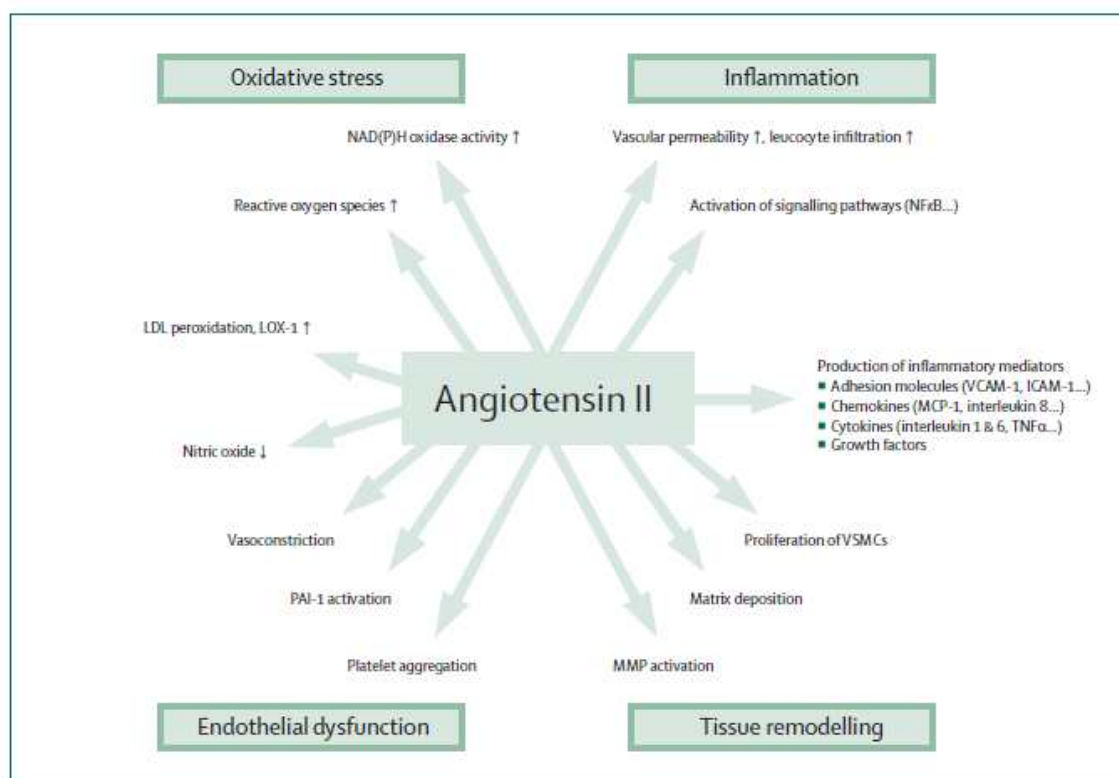
La sede preferenziale di produzione della renina è localizzata nelle cellule dell'apparato iuxtaglomerulare renale. Vi sono però altre sedi all'interno dell'organismo in cui la renina e tutte le componenti del sistema possono essere sintetizzate in maniera autonoma; sono stati identificati e caratterizzati sistemi renina-angiotensina locali o tissutali indipendenti, provvisti di un complesso apparato enzimatico-proteico in grado di affiancare l'azione del sistema endocrino classico, rivestendo pure un ruolo significativo nelle emergenze fisiologiche (sete, ipertermie), nonché nello sviluppo delle malattie quali, ipertensione arteriosa, cardiopatia ischemica, scompenso cardiaco.

L'angiotensina II si lega con recettori cellulari specifici, di cui si conoscono due principali sottotipi (Figura V). Il recettore  $AT_1$ , ad alta affinità di legame con l'angiotensina II, media le funzioni del sistema a livello cardiovascolare, renale, surrenale e cerebrale, tra cui

inibizione della produzione di renina, vasocostrizione arteriolare, riassorbimento di sodio a livello del tubulo prossimale renale, aumento della secrezione di vasopressina e di aldosterone, trasporto di calcio a livello intracellulare e conseguente ipertrofia cellulare, promozione dell'infiammazione e dello stress ossidativo, aumento dello stimolo della sete. Nello specifico, l'Ang II regola l'espressione di molecole d'adesione, chemochine e citochine, tali composti inducono a loro volta disfunzione delle cellule endoteliali, l'ossidazione e l'uptake delle LDL, ed inoltre, la proliferazione delle cellule della muscolatura liscia (smooth muscle cells). Con la progressione della lesione ateromatosa, l'Ang II stimola l'espressione di metallo proteasi (MMPs) e l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1), portando così ad una destabilizzazione della placca e ad un'alterazione del bilancio fibrinolitico. Inoltre, l'Ang II sovra esprime fattori di crescita quali VEGF, in grado di promuovere un avanzamento dell'angiogenesi (Sata et al.). Il sottotipo AT<sub>2</sub>, che espresso nei tessuti adulti solo in particolari condizioni, determina effetti pressoché opposti, tra cui vasodilatazione arteriolare, inibizione della crescita e della proliferazione cellulare, rigenerazione neuronale e differenziazione cellulare, riduzione dello stress ossidativo. L'angiotensina II può legare altri due tipi di recettori, AT<sub>3</sub> ed AT<sub>4</sub>, la cui funzione biologica è tuttora in via di definizione, per poi essere degradata in frammenti biologicamente inattivi e di piccole dimensioni, che potrebbero svolgere azioni rilevanti esercitando un'attività di modulazione integrata sulla biosintesi e sulla secrezione di renina, probabilmente anche nell'ambito dei tessuti.

Questa visione classica del sistema renina-angiotensina è stata ampliata da recenti scoperte le quali sostengono che RAS è attiva localmente, in particolare nel cuore, nelle arterie, nei reni e nel cervello (Sata et al.), e sembra che in questi tessuti vi siano altri componenti del sistema RAS che permettono a livello locale la sintesi di alcuni peptidi dell'angiotensina. L' Ang II inoltre, come da quanto riportato in diversi lavori, sembra essere generata anche da altri enzimi, come ad esempio le chimasi. Tutti questi risultati portano alla conclusione che Ras potrebbe essere attivato localmente e regolato

dall'interazione dei vari componenti del sistema RAS nei diversi organi (Arakawa et al. 2000).



**Figura V. Diverse funzioni dell'angiotensina II.** Roland E Schmieder et al, *Lancet* 2007; 369: 1208–19

L'importanza dei tradizionali fattori di rischio per le malattie vascolari aterosclerotiche, come l'aumento del colesterolo LDL, l'ipertensione, il fumo e lo stile di vita, sono ben conosciuti. Negli ultimi anni, la ricerca ha mostrato chiare evidenze per altri importanti meccanismi, connessi con l'insorgenza dell'aterosclerosi. Questi meccanismi includono l'infiammazione vascolare, la generazione di composti reattivi dell'ossigeno e alterazioni della funzione endoteliale. Oltremodo, evidenze cliniche e sperimentali indicano che l'attivazione del sistema renina–angiotensina, mediante il legame dell'angiotensina II ai recettori AT1, quali maggiori effettori, presenta un ruolo centrale nell'attivare tutti questi

pathways. Difatti, a livello dell'aterosclerosi, sembra che l'Ang II eserciti delle azioni pro infiammatorie sulle pareti vasali, portando così alla progressione e destabilizzazione della lesione aterosclerotica (Sata et al.).

La produzione di citochine infiammatorie, come l'interleuchina 1 (IL-1), l'interleuchina 6 (IL-6) e il tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), giocano un'azione fondamentale nella patogenesi dell'aterosclerosi. La concentrazione di citochine circolanti è correlata in pazienti con aterosclerosi coronarica. Sia l'IL-6 che i recettori AT1 di fatto, sono stati individuati nelle placche ateromatose stabili ed instabili, legati da una relazione bidirezionale; ossia l'IL-6 induce una sovra regolazione a livello vascolare dell'espressione dei recettori AT1 ed è così possibile osservare un aumento della produzione di IL-6 in risposta all'attivazione dei suddetti recettori. Il prolungato stato pro-infiammatorio sembra quindi avere un ruolo chiave nella trasformazione della placca ateromatosa stabile in una placca vulnerabile, predisposta alla rottura (Schmieder et al. 2007).

Inoltre l'angiotensina II stimola un fattore di trascrizione nucleare, nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) che sembra funzionare come sistema di segnalazione per stimoli infiammatori nell'aterogenesi, portando ad un incremento dell'espressione delle molecole di adesione (ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina), di monocyte chemoattractant proteins (MCP-1) e dell'interleuchina-8 (IL-8). In uno studio a doppio cieco, pazienti ipertesi con elevati livelli di proteina C reattiva ad alta sensibilità, dopo un trattamento per 6 settimane con olmesartan, bloccante dei canali del calcio, hanno mostrato una riduzione nei livelli di infiammazione micro vascolare (Fliser et al. 2004).

L'ipertensione è la più comune malattia cardiovascolare. Ne sono affetti approssimativamente 1000 milioni di individui in tutto il mondo (Chobanian et al. 2003). Nei soli Stati Uniti circa ¼ della popolazione presenta una pressione sistolica e/o diastolica superiore a 140/90 mmHg. Nel caso di soggetti ipertesi ad alto rischio, come i diabetici o pazienti aventi malattie cliniche cardiovascolari, dovrebbero essere raggiunti valori sotto i 130/80 mmHg (Otero 2007). L'ipertensione rappresenta un fattore di rischio per l'ictus,



l'infarto miocardico, l'insufficienza cardiaca, l'insufficienza renale e nella dissecazione aneurismatica dell'aorta. C'è una relazione continua tra i livelli di pressione arteriosa e il rischio cardiovascolare, tanto che maggiore è la riduzione della pressione sanguigna (BP), più grandi sono i benefici. Nei pazienti ipertesi ridurre la pressione diastolica di 5-6mmHg si associa ad una riduzione del rischio di ictus cerebrale e di cardiopatia ischemica pari rispettivamente al 42% e al 14%.

Nonostante la ben riconosciuta necessità di abbassare la BP al fine di ridurre l'alta mortalità associata all'ipertensione, solo circa la metà di tutti i pazienti ipertesi trattati raggiunge una BP sistolica (SBP) <140 mmHg e BP diastolica (DBP) <90mmHg. La maggior parte dei pazienti richiederà due o più trattamenti anti-ipertensivi per raggiungere la BP richiesta (Chobanian et al. 2003). Le principali linee guida per il trattamento dell'ipertensione raccomandano l'uso di una terapia di combinazione con basse dosi di agenti provenienti da differenti classi anti-ipertensive, piuttosto che incrementare ulteriormente il dosaggio dell'agente iniziale, quando la terapia di partenza non determina il raggiungimento della BP prefissata. I vantaggi di una terapia di combinazione sono una più elevata probabilità di controllare la BP e le sue complicazioni, usando farmaci con meccanismi di azione differenti e complementari; la possibilità, oltre che di usare basse dosi di farmaci con minori rischi di riscontrare effetti collaterali, che il costo sia inferiore rispetto ai componenti individuali prescritti separatamente e la considerazione che la somministrazione di combinazioni fissate di differenti farmaci in una singola compressa incrementi l'accondiscendenza del paziente, specialmente quando si utilizzano farmaci a lunga durata d'azione richiedenti somministrazione giornaliera.

Una controversia durata anni ha riguardato la superiorità di alcuni farmaci anti-ipertensivi, specialmente diuretici o beta bloccanti, nei confronti dei bloccanti del canale del calcio (Calcium Channel Blockers CCB), ACE inibitori e bloccanti del recettore dell'angiotensina (Otero 2007).

Nonostante la combinazione di un diuretico e di un ACE inibitore sia quella più comunemente utilizzata in pratica clinica, i calcio antagonisti e gli ACE inibitori rappresentano due classi di farmaci efficaci per il trattamento dell'ipertensione e se usati in combinazione si sono mostrati essere anche ben tollerati. Sono due le categorie principali di farmaci in grado di bloccare l'azione dell'angiotensina II:

- ARBs: farmaci che bloccano in maniera specifica il legame dell'AngII ai recettori di tipo 1, perchè vanno a sostituirsi all'Ang II nel legame a questi recettori;
- ACEs: farmaci che inibiscono l'enzima ACE, riducendo quindi la produzione della stessa Ang II. Questi farmaci hanno anche la funzione di inibire la trasformazione della bradichinina, portando quindi ad un incremento della produzione di ossido nitrico.

Studi epidemiologici riportano che entrambe le categorie di farmaci possono avere effetti favorevoli sulla funzione endoteliale, sulla funzione cardiaca, sulla funzione cerebro vascolare e sulla funzione renale, oltre che ridurre la pressione sanguigna. In particolare, la combinazione delapril/manidipina comprende due farmaci con differente meccanismo di azione e effetti farmacodinamici additivi o complementari (McCormack et al. 2006).

### ***Antagonisti dei canali del calcio***

Gli antagonisti dei canali del calcio sono utilizzati con successo nella terapia di malattie cardiovascolari, come l'angina pectoris e l'ipertensione (Richard 2005). Recentemente, l'attenzione si è spostata da farmaci detti di "prima generazione", quali verapamile, diltiazem e nifedipina caratterizzati da una breve durata d'azione, a farmaci nuovi a lunga durata d'azione e con una migliore tollerabilità. Questi includono farmaci di "seconda generazione" come nitrendipina e nisoldipina, e farmaci di "terza generazione", maggiormente lipofili quali manidipina, lacidipina e lercanidipina, dotati della capacità di legarsi saldamente alla membrana e permettendo un lento rilascio del principio attivo.

Difatti una svolta nel trattamento dei diversi disordini cardiovascolari è stata raggiunta in seguito alla scoperta del principio di antagonismo dei suddetti canali. Tale principio è stato rapidamente convertito in trattamento farmacologico grazie all'utilizzo di composti come DHP nifedipina e verapamile.

La famiglia dei canali del calcio è composta da almeno 10 membri differenti per caratteristiche strutturali, per la composizione delle subunità presenti, per locazione, per proprietà biofisiche e farmacologiche. I canali del calcio di tipo L a livello cardiaco sono delle proteine multimeriche che consistono di un poro centrale formante la subunità  $\alpha_1$ , con un peso approssimativo di 190-250kDa, in grado di sostenere la maggior parte delle funzioni di questi tipi di canali ed è anche il sito farmacologico per i modulatori degli stessi canali. La sub unità  $\alpha_1$  dei canali del  $\text{Ca}^{++}$  di tipo L è codificata dal gene di classe C (subunità  $\alpha_{1c}$ ), la cui parte centrale è associata ad una transmembrana, complesso legante il disolfuro della subunità  $\alpha_{16}$ , alla subunità  $\beta$  citoplasmatica e in alcuni casi anche alla subunità  $\gamma$ . Esse possono divenire target per il legame a nuovi farmaci (Richard 2005).

Le tre principali classi di farmaci antagonisti di tali canali, a cui essi sono strutturalmente riconducibili, sono: fenilalchilamine (diltiazem); benzotiazepine (verapamil) e 1,4-DHPs (nifedipina). Agiscono sulla subunità centrale ( $\alpha_{1c}$ ) ed esibiscono diversi effetti funzionali in base alla loro struttura, ad esempio il diltiazem e il verapamil esercitano un blocco frequenza-dipendente, mentre i DHPs agiscono mediante il blocco voltaggio-dipendente, inducendo così depolarizzazione degli stessi canali. In parte per tale ragione, i DHPs si dimostrano essere dei potenti vasodilatatori in confronto ai farmaci loro precursori, e più di loro sono privi delle proprietà dipendenti la frequenza e gli effetti cardiodepressivi.

L'azione anti-ipertensiva dei calcio antagonisti è fondamentalmente attribuibile alla vasodilatazione arteriolare periferica, determinata dalla riduzione della disponibilità dello ione calcio a livello della cellula muscolare liscia della tonaca media della parete arteriosa, raggiunta bloccando i canali del calcio di tipo L (presenti in particolare sulla membrana delle fibrocellule muscolari lisce vasali e cardiache).

Anch'essi riducono l'ipertrofia ventricolare, praticamente allo stesso modo degli ACE inibitori. I loro effetti renali sono controversi, forse perché l'effetto vasodilatatore è limitato all'arteriola afferente e tendono a incrementare la pressione intraglomerulare che potrebbe eventualmente essere associata con la progressione di malattie renali. Inoltre sia in animali che umani, i CCB riducono la progressione dell'aterosclerosi.

I calcio antagonisti diidropiridinici agiscono principalmente sul letto vascolare periferico e pertanto determinano in primo luogo una riduzione delle resistenze periferiche con un minore effetto sull'inotropismo cardiaco. Questi farmaci possono essere caratterizzati da una specifica selettività vascolare per cui l'entità del loro effetto vasodilatante può variare nei diversi letti vascolari, anche se una riduzione del tono vasale si può osservare in tutti i distretti periferici (Richard 2005).

### ***Inibitori dell'enzima di conversione dell'Angiotensina (ACE)***

L'ACE è l'enzima chiave per la produzione dell'Ang II nel sistema SRAA. Esso è distribuito in maniera ubiquitaria in tutto il corpo, compreso il CNS (Shi et al.); esiste prevalentemente in due forme, legato alla membrana cellulare o in forma solubile, quest'ultimo si trova nel plasma, nel liquido amniotico, nel plasma embrionale e in altri liquidi del corpo. Sono stati individuati due diversi isoenzimi: la forma somatica e la quella germinale. La prima è l'isoenzima endoteliale diffuso in tutto il corpo e composto da due domini simili tra loro, ognuno dei quali contiene un sito catalitico funzionale. L'altro isoenzima è diffuso esclusivamente nei testicoli e, con l'eccezione dell'aminoacido in posizione 67 del dominio N-terminale, è strutturalmente identico al dominio C-terminale dell'isoenzima endoteliale, contenente così un solo sito catalitico. Entrambe le forme svolgono la propria funzione sulla superficie cellulare in grado di idrolizzare peptidi circolanti. L'ACE, detta chinasi II, così chiamata per la sua capacità di convertire l'Ang I in Ang II e in grado di inattivare la bradichinina, sembra rivestire un ruolo importante nel regolare la ormoni vasocostrittori (Ang II e bradichinina) in vari tessuti e nel sangue.

Gli ACE inibitori sono farmaci che trovano impiego, nel campo dell'ipertensione, dello scompenso cardiaco congestizio, nell'infarto miocardico e prevenzione del reinfarto e nell'insufficienza renale cronica. Abbassano la BP riducendo i livelli circolanti di angiotensina II inibendo l'enzima di conversione dell'angiotensina nella parete dei vasi e in molti tessuti come il cuore e cervello. Questo enzima, oltre a catalizzare la degradazione del mediatore bradichinina in prodotti inattivi, determina la sintesi del vasocostrittore angiotensina II, mediante scissione dei due aminoacidi C-terminali da un suo precursore inattivo, il decapeptide angiotensina I, a sua volta prodotto a partire dall'angiotensinogeno grazie all'enzima proteolitico renina secreto dal rene. La riduzione dei livelli di angiotensina II porta anche ad una diminuzione della liberazione di aldosterone dalla corteccia surrenale e influenzando sul bilancio idrico (sistema renina-angiotensina-aldosterone) (Shi et al.).

Tali inibitori presentano una somiglianza ad un'estremità della catena peptidica dell'angiotensina I e, di conseguenza, vengono scambiati dall'enzima di conversione dell'angiotensina per il suo substrato fisiologico ma, al contrario di esso, non vengono trasformati dall'enzima e lo bloccano. Molti ACE inibitori sono profarmaci, con un'attività da 100 a 1000 volte minore rispetto al metabolita attivo. Dal punto di vista dell'efficacia, le diverse molecole sono sovrapponibili, e differiscono tra loro in base al fatto di presentarsi sottoforma di farmaco/profarmaco, alla potenza e alle caratteristiche farmacocinetiche.

Riducono l'ipertrofia ventricolare sinistra più degli altri farmaci anti-ipertensivi e questo effetto è probabilmente dovuto in parte alla loro azione sul sistema cardiaco renina-angiotensina. Nei reni, gli ACE inibitori diminuiscono la costrizione delle arteriole efferenti indotta dall'angiotensina II, riducendo la pressione intraglomerulare e proteggendo il rene, specialmente nei soggetti ipertesi diabetici. Nei pazienti diabetici di tipo 1 diminuiscono la mortalità e la lenta progressione verso l'insufficienza renale. Essi riducono anche l'escrezione urinaria di albumina e la progressione della nefropatia con proteinuria. Infine gli ACE inibitori, a confronto con altre classi di farmaci anti-ipertensivi, migliorano

l'insulino resistenza associata all'ipertensione e riducono l'incidenza del diabete mellito (Otero 2007).

### ***Manidipina & Delapril***

#### **- Proprietà farmacodinamiche**

La manidipina è una diidropiridina di terza generazione appartenente alla famiglia dei calcio-antagonisti, in grado di esercitare i suoi effetti anti-ipertensivi in seguito all'inibizione dei canali del  $\text{Ca}^{++}$  sia di tipo L che T, localizzati nelle cellule della muscolatura liscia vascolare (Coca 2007). Il risultato netto della sua azione consiste nella vasodilatazione e nella riduzione delle resistenze vascolari periferiche. Per la sua lipofilia, la manidipina si accumula nelle membrane contenenti lipidi e lentamente viene rilasciata prima di raggiungere i suoi siti di destinazione (ad esempio, i canali del calcio voltaggio-dipendenti). Questo "magazzino a lento rilascio" può spiegare la lenta insorgenza e la lunga durata d'azione della sostanza in esame. Comparato con i vecchi calcio-antagonisti, i composti di terza generazione dimostrano un alto grado di selettività per l'attività di vascolarizzazione e per le attività cardiodepressive trascurabili. La manidipina presenta marcati effetti a livello della vascolarizzazione renale, dove è stato dimostrato la sua capacità nel dilatare arteriole afferenti ed efferenti; nell'incrementare la velocità del flusso di sangue e della filtrazione glomerulare a livello renale in pazienti affetti da ipertensione, causando così un abbassamento della pressione di perfusione renale. A differenza di altri  $\text{Ca}^{++}$  antagonisti, come l'amilodipina e la felodipina, il dosaggio terapeutico della manidipina non incrementa in modo significativo i livelli di noradrenalina durante il periodo di trattamento, suggerendo una mancata attivazione del sistema simpatico.

Il delapril è un composto non sulfidrilico appartenente alla famiglia degli inibitori dell'enzima ACE e di natura lipofila (Coca 2007). E' un profarmaco esterificato, il quale è sottoposto ad un rapido metabolismo con conseguente produzione di un metabolita

attivo, denominato delaprilat (M1), a sua volta trasformato da un lato in un ulteriore metabolita attivo, diacido 5-idrossi-indano (M3) e dall'altro in un composto inattivo (M2). Il delapril esercita la sua attività di inibizione nei confronti dell'enzima ACE sia in vivo che in vitro, portando quindi ad inibire la sintesi dell'AngII. Per le sue proprietà lipofile, sembra essere più potente rispetto agli altri farmaci facenti parte della stessa famiglia (come captopril e enalapril), ed inoltre, risulta avere una maggiore specificità per l'enzima ACE presente nei tessuti rispetto a quello circolante, per questo motivo gli è stato attribuito la capacità di avere una durata d'azione di 24 ore riguardante la sua attività anti-ipertensiva.

- **Proprietà farmacocinetiche**

La manidipina è rapidamente assorbita in seguito a somministrazione orale, con  $t_{max}$  di circa 1 ora e 30 minuti. Se somministrata dopo i pasti, aumenta il grado di assorbimento, e a questa fase segue poi il suo metabolismo da parte di isoenzimi del citocromo P450 in metaboliti farmacologicamente inattivi. È stato riscontrato che il 63% della dose somministrata viene escreta nelle feci, con una piccola percentuale nell'urina. In pazienti affetti da disfunzioni epatiche severe, la sua biodisponibilità aumenta per conseguente ritardo nella sua eliminazione (Coca 2007).

Il delapril, somministrato per via orale, viene rapidamente assorbito dal tratto gastrointestinale, per poi essere metabolizzato nei suoi metaboliti attivi e non, M1 (delaprilat), M3 ed M2, con  $t_{max}$  che va da 1 ora ad massimo di 2 ore per i suoi metaboliti. Il cibo apparentemente non ha effetti sul suo grado di assorbimento ed in seguito a somministrazioni ripetute non sembra esserci accumulo. Inoltre, la concentrazione del metabolita M1 nel plasma è direttamente correlata alla dose di farmaco somministrata e la sua eliminazione avviene per il 56% nelle urine, così come quella dei suoi metaboliti: M1 viene eliminato per il 21,4% e M3 per il 30,4%. Come per la manidipina, anche per il delapril, la velocità di eliminazione dal corpo diminuisce in pazienti con insufficienza renale.

Per entrambi i tipi di farmaci è possibile riscontrare eventi avversi. La terapia con manidipina può presentare effetti come edema alle caviglie (6%), cefalea (4%),

palpitazioni (3%), arrossamento (2%) e vertigini (2%); mentre il trattamento farmacologico con delapril può manifestarsi con vertigini, mal di testa, nausea, vomiti, tosse e affaticamento (Coca 2007).

- **Associazione manidipina-delapril**

E' stato dimostrato come la terapia combinata manidipina/delapril sia in grado di migliorare la funzione fibrinolitica, compromessa in pazienti affetti da ipertensione e diabete mellito di tipo 2 (McCormack et al. 2006). In uno studio condotto su pazienti con ipertensione incontrollata e diabete di tipo 2, i livelli di creatinina nel siero risultavano aumentati dopo un trattamento di 50 settimane in seguito alla terapia con ramipril o valsartan/HCTZ, ma non dopo un trattamento combinato di manidipina/delapril alla dose giornaliera di 10mg/30mg, suggerendo così una protezione renale da parte di tale terapia.

Inoltre, è stato possibile osservare come la cosomministrazione di singole dosi orali di delapril 30mg e manidipina 10mg in pazienti sani di sesso maschile non abbia alterato in maniera significativa la farmacocinetica di entrambi i principi attivi o dei loro principali metaboliti, e che, dopo la somministrazione di singole dosi in giovani volontari adulti dei vari farmaci, sia presente una stretta bioequivalenza tra il trattamento farmacologico combinato e quello monoterapico. Anche a dosaggi ripetuti non si verificano accumuli nella circolazione sistemica o nei diversi organi.

Il giusto dosaggio della combinazione manidipina/delapril nell'esplicare l'effetto anti-ipertensivo fu determinato in uno studio di tipo randomizzato, a doppio - cieco, multicentrico composto da 400 pazienti con una età media di 52 anni, affetti da ipertensione essenziale da lieve a moderata. In questo studio sono stati utilizzate le dosi giornaliere di manidipina 5 o 10mg e quelle del delapril di 15 o 30mg, confrontate con placebo per 6 settimane, e seguite ogni settimana da un periodo pari a 2 settimane in cui i pazienti ricevevano solo soluzione placebo. Da ciò è stata individuata la combinazione dei due farmaci più efficiente nel ridurre la pressione sanguigna diastolica e sistolica dai 15/13mmHg, rispettivamente (McCormack et al. 2006).



Sempre in un ulteriore studio randomizzato, a doppio - cieco e multicentrico, è stata comparata l'efficacia dell'azione anti-ipertensiva della terapia combinata manidipina/delapril (10/30mg) con quella espressa dal trattamento monoterapico con manidipina 10mg o delapril 30mg, somministrati una volta al giorno per 12 settimane in pazienti affetti da lieve a moderata ipertensione essenziale. Alla fine della 12ima settimana, la riduzione media della pressione diastolica rispetto alla situazione controllo era intorno ai 14mmHg per la terapia combinata e di 11 e 10mmHg in pazienti trattati con i farmaci dati singolarmente; e ugualmente per la pressione sistolica è stato osservata una riduzione significativa in pazienti con terapia combinata (19mmHg) rispetto a quella riscontrata per il trattamento con solo la manidipina o il delapril (15 e 14mmHg) (McCormack et al. 2006).

Tra i diversi studi, è stato osservato, in uno trial randomizzato, multicentrico, su pazienti con ipertensione essenziale da lieve a moderata, una differenza sostanziale tra il trattamento giornaliero con delapril a 30mg o enalapril 20mg per 8 settimane, a cui ha fatto seguito un trattamento di altrettante 8 settimane con manidipina 10mg o HCTZ di 12,5mg, rispettivamente, rispetto ad una situazione basale. Dopo le 16 settimane di terapia, infatti, la riduzione della pressione diastolica e sistolica era pari al 69 e 61% confrontata con il controllo, senza evidenziare particolari differenze tra i due diversi trattamenti farmacologici.

Dai vari trials clinici si è evinto che la terapia combinata manidipina/delapril è generalmente ben tollerata, e i possibili effetti avversi che si possono verificare sono associati a quelli riscontrabili nella monoterapia con questi due farmaci. Più comunemente si osserva tosse e mal di testa, inoltre si verifica una riduzione dell'edema dell'anca rispetto al solo trattamento con la manidipina. La dose giornaliera raccomandata di solito è di 30/10mg (delapril/manidipina) per un individuo adulto, dopo i pasti e tale dosaggio deve essere modificato in pazienti con livelli plasmatici di creatinina >3mg/dL o affetti da severi disturbi a livello epatico.

La combinazione farmaceutica manidipina/delapril è stata approvata in Austria, Brasile, Germania, Grecia, Italia e Spagna per il trattamento dell'ipertensione essenziale negli adulti in cui è stato stabilito che la pressione sanguigna non viene ugualmente controllata con il singolo trattamento di delapril o manidipina (McCormack et al. 2006).

*Scopo della ricerca*

## Scopo 1: studio ApoE

L'apolipoproteina E riveste un ruolo cruciale nella regolazione dell'omeostasi del colesterolo. Essa agisce sia a livello sistemico che macrofagico. La proteina a livello sistemico è in grado di mediare l'uptake lipoproteico attraverso il legame ai recettori delle LDL e all' LRP, presenti sulla superficie degli epatociti (Mahley et al. 2000). L'apoE nel macrofago esplica il suo ruolo ateroprotettivo grazie alla sua ulteriore capacità di promuovere l'efflusso di colesterolo, step limitante il processo di trasporto inverso del colesterolo (Greenow et al. 2005).

É ampiamente dimostrato in letteratura che in topi apoE<sup>-/-</sup>, il profilo lipoproteico è alterato rispetto ad un topo con patrimonio genetico normale. Questi topi sono caratterizzati da un incremento di lipoproteine contenenti apoB (VLDL e chilomicroni remnant), e dalla riduzione del contenuto plasmatico di HDL. Il tutto si manifesta in uno sviluppo precoce e spontaneo della formazione delle placche ateromasiche, e per questo motivo i topi apoE<sup>-/-</sup> sono stati il primo modello utilizzato nello studio di iperlipidemie e nella patologia dell'aterosclerosi.

Nel nostro laboratorio, in un primo esperimento di RCT su topi apoE<sup>-/-</sup> riceventi macrofagi apoE<sup>-/-</sup> (apoE<sup>-/-</sup>/apoE<sup>-/-</sup>) e su topi WT riceventi macrofagi WT (WT/WT), si é potuto osservare come l'RCT sia significativamente compromesso negli animali in cui è assente la proteina. I livelli di [<sup>3</sup>H] colesterolo dei topi apoE<sup>-/-</sup>/ apoE<sup>-/-</sup> nel fegato e nelle feci erano significativamente ridotti rispetto ai WT/WT, andamento diverso nel plasma. La somma della radioattività trovata nei diversi distretti portava ad una ridotta mobilitazione di colesterolo dai macrofagi negli animali deficitari dell'apoE. Partendo da questi dati preliminari, in cui emerge il ruolo determinante dell'apoE nel processo di RCT, lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare l'impatto della proteina a livello sistemico e macrofagico mediante lo studio dell'RCT in vivo. L'attività macrofagica

dell'apolipoproteina E è stata studiata in topi WT riceventi macrofagi apoE<sup>-/-</sup>, mentre quella sistemica mediante un RCT in cui a topi apoE<sup>-/-</sup> sono stati iniettati macrofagi WT.

## **Scopo 2: studio ACAT2**

L'Acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2), localizzato negli epatociti e enterociti, è un enzima deputato alla sintesi del colesterolo estere, principalmente di oleato e palmitato, sul contenuto in lipoproteine contenenti apoB (Rudel et al. 2005). Nell'uomo si attribuisce indirettamente l'accumulo nel plasma degli esteri del colesterolo, derivanti dall'azione dell'ACAT2, ad un incremento della IMT e dell'indice di morte per malattie cardiovascolari. Nelle scimmie e nei topi, quest'accumulo è stato correlato direttamente ad un incremento dell'aterosclerosi, e per questo l'ACAT2 è considerato un nuovo target per CVD.

Si è visto che in seguito ad una down-regolazione dell'attività epatica dell'enzima si assiste ad una variazione dei livelli di HDL circolanti, ed una modificazione della frazione di queste particelle, con diversa distribuzione delle sue sottopopolazioni.

Lo scopo generale del lavoro, condotto nei laboratori della divisione di Clinical Chemistry, Dept of Laboratory Medicine Molecular Nutrition Unit, Dept for Biosciences and Nutrition presso il Karolinska Institutet di Stoccolma, sulla base dei risultati ottenuti riguardo le variazioni nella distribuzione delle varie sottopopolazioni delle HDL, è stato di valutare in vitro il potenziale di efflusso di colesterolo da cellule a siero di topo WT e double knockout per LXR $\alpha$  e  $\beta$ , trattati o meno con un oligonucleotide antisense (ASO6), in grado di favorire una down-regulation dell'enzima ACAT2.

### **Scopo 3: studio manidipina/delapril**

I processi coinvolti nella modulazione della composizione e vulnerabilità della placca ateromassica, rivestono un ruolo fondamentale nello sviluppo e progressione della patologia aterosclerotica. Diverse evidenze sperimentali sembrano proporre i calcio antagonisti e gli ACE inibitori quali farmaci in grado di intervenire favorevolmente su questi meccanismi, mostrando marcati effetti antiaterosclerotici che possono potenziare ed essere complementari agli effetti ottenuti attraverso la riduzione dei fattori di rischio, quali l'ipertensione. L'effetto primo di queste classi di farmaci è quello di ridurre la pressione sanguigna tramite differenti meccanismi d'azione, ma recentemente l'attenzione è posta sui potenziali effetti pleiotropici che sono in grado di promuovere. Nel nostro laboratorio è stato dimostrato che i  $\text{Ca}^{++}$  antagonisti diidropiridinici di ultima generazione, di natura lipofila, esercitano un effetto antiaterosclerotico diretto, andando a modulare il metabolismo del colesterolo nei macrofagi, portando ad un decremento dell'accumulo di lipidi nell'aorta degli animali trattati (Bernini et al. 1997).

Lo scopo in questa parte dello studio è stato quello di valutare se l'associazione manidipina/delapril sia in grado di prevenire o ridurre lo sviluppo dell'aterosclerosi nel modello sperimentale di aterogenesi del topo knockout per l'apolipoproteina E. I parametri presi in considerazione sono stati: la valutazione della lesione aterosclerotica nell'aorta degli animali, da un punto di vista morfologico e del contenuto lipidico; l'espressione delle molecole di adesione a livello della lesione, VCAM-1; e infine, la valutazione della concentrazione plasmatica di IL-6.

## *Materiali e metodi*

## Studio sull'apoE macrofagica e sistemica

### *Animali*

Topi maschi C57BL/6 (WT) e apoE<sup>-/-</sup> (B6.129P2-Apoe<sup>tm1Unc</sup>/CrL) (The Jackson Laboratory, Harbor, ME, USA) di circa 11 settimane d'età sono stati alimentati con dieta normale. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico per Esperimenti su Animali dell'Università di Parma.

### *RCT macrofagico in vivo*

L'RCT macrofagico è stato valutato seguendo la metodica descritta da Zhang Y et al (Zhang et al. 2003), utilizzando macrofagi peritoneali murini (MPM) da topi WT e apoE<sup>-/-</sup> come donatori di colesterolo. In seguito alla raccolta dei macrofagi dal peritoneo dei topi precedentemente trattati con tioglicolato, le cellule sono state incubate per 48 ore con medium addizionato di <sup>3</sup>H-cholesterol (5μCi/ml) e AcLDL (25μg/ml).

Nel primo esperimento (RCT1), i topi WT hanno ricevuto macrofagi da topi WT (WT/WT) (n=5) o apoE<sup>-/-</sup> (apoE<sup>-/-</sup>/WT) (n=5). Nel secondo esperimento (RCT2), entrambi i ceppi di animali hanno ricevuto MPM provenienti da topi WT (WT/WT e apoE<sup>-/-</sup>/WT, n=5 rispettivamente). L'accumulo di colesterolo nei macrofagi carichi, espresso come μg colesterolo/mg proteine, è simile tra cellule WT e apoE<sup>-/-</sup> (62,7±4,9 vs 52,1±1,7, rispettivamente), così come l'esterificazione del colesterolo è comparabile, confermando che l'apoE non incide né sull'uptake delle LDL acetilate né sull'attività dell'ACAT (Langer et al. 2000). In seguito all'iniezione degli MPM donatori, i topi sono stati separati in gabbie singole e sacrificati alle 48 ore. Il sangue è stato raccolto alle 48 ore mediante prelievo diretto dal cuore, in eppendorf di plastica, all'interno dei quali è stata aggiunta una piccola quantità di anticoagulante (3.8% di citrato di sodio, con diluizione 1:9). Il sangue viene centrifugato a 3000rpm per 15min a 4°C, favorendo la separazione del plasma dalla



frazione corpuscolata che precipita. Il surnatante viene prelevato e conservato in freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'uso. I fegati e le feci sono stati estratti seguendo la metodica di Bligh and Dyer (Iverson et al. 2001; Zanotti et al. 2008). I livelli di  $^3\text{H}$ -cholesterol sono stati poi quantificati nei diversi distretti (plasma, fegato e feci), come percentuale di  $^3\text{H}$ -cholesterol iniettato. La variabilità della radioattività riscontrata nei diversi esperimenti rientra nei limiti riportati da altri lavori (Zhang et al. 2005; Wang et al. 2007).

### ***Analisi lipidiche***

I livelli totali di colesterolo nel plasma sono stati determinati utilizzando una tecnica enzimatica standard con un appropriato kit, Roche diagnostics Integra 400, usato anche per la determinazione dei livelli plasmatici di colesterolo HDL, dopo successiva rimozione della lipoproteine contenenti apoB. In breve, 100 $\mu\text{l}$  di plasma in toto sono stati incubati con 50 $\mu\text{l}$  di  $\text{MgCl}_2$  2M e 50 $\mu\text{l}$  di destrano solfato 2% per 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ ; per poi essere centrifugati a 1500g per 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Il surnatante raccolto è stato utilizzato per la quantificazione del colesterolo totale. L' apoAI plasmatica, calcolata come mg/dl, è stata valutata mediante Western Blot usando un anticorpo anti-mouse apoAI e una curva standard contenente una concentrazione nota di apoAI murina.

### ***Valutazione dell'efflusso lipidico***

I macrofagi peritoneali estratti da topi WT e apoE $^{-/-}$  sono stati seminati in piastre da 24 pozzetti, arricchiti di colesterolo AcLDL (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) e radiomarcati con  $^3\text{H}$ -cholesterol (2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ), in presenza dell'inibitore dell'enzima ACAT (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) per 24 ore. A questa fase è seguito l'equilibramento con medium contenente albumina (BSA) allo 0,2% per 24 ore e l'efflusso è stato promosso a plasma intero di topo WT a concentrazioni crescenti per 24 e 48 ore. La quantificazione dell'efflusso di colesterolo è stata eseguita usando al tempo zero ( $T_0$ ) un set di cellule in modo da calcolare il contenuto di radioattivo presente nel monostrato cellulare (Favari et al. 2009). Il tutto espresso come rapporto percentuale dei cpm di  $^3\text{H}$  presenti nel medium e i cpm di  $^3\text{H}$  al tempo zero ( $T_0$ ).

### ***Valutazione del potenziale di efflusso delle HDL***

La capacità delle HDL provenienti da topi WT e apoE<sup>-/-</sup> di promuovere l'efflusso di colesterolo cellulare in vitro, è stata valutata in MPM WT arricchiti di colesterolo, mediante un metodo di analisi standard per la quantificazione dell'efflusso lipidico descritto precedentemente. Nella fase di equilibramento, alcune cellule sono state trattate con probucolo 10 $\mu$ M o BLT-1 1 $\mu$ M, inibitori selettivi di ABCA1 e SR-B1 rispettivamente. Il rilascio di colesterolo dalle cellule è stato promosso a plasma di topo diluito allo 0,1-0,5-1% dopo eliminazione della porzione di lipoproteine contenenti apoB.

### ***Elettroforesi bidimensionale su gel***

Le sottoclassi di HDL sono state separate con l'analisi elettroforetica bidimensionale, in cui dopo elettroforesi su gel di agarosio è stata effettuata un'elettroforesi su gel di poliacrilammide non denaturata. L'anticorpo usato per l'immunodetection è un antimouse apoAI (Zanotti et al. 2008).

### ***Determinazione del colesterolo intracellulare***

La determinazione del quantitativo di colesterolo presente all'interno del monostrato cellulare si effettua mediante determinazione enzimatica. Le cellule lisate per aggiunta di una soluzione all'1% di colato di sodio in acqua, supplementata di 50U/ml di DNA-asi, vengono lasciate ad agitare su di un apposito supporto fino al giorno successivo. Ad ogni pozzetto vengono aggiunti poi 125 $\mu$ l di reaction buffer 5X, tampone di reazione contenente triton-X-100 allo 0,5 %, 0,5 M di fosfato di potassio (pH=7,4) e 1 % di sodio colato e lasciati ad agitare per altri 30min. La lisi dei monostrati cellulari viene completata mediante l'utilizzo di una siringa da 1 ml, e successivamente 600  $\mu$ l del contenuto di ogni pozzetto vengono trasferiti in vials di plastica e lasciati a sonicare per 30min. I campioni all'interno delle vials vengono poi scaldati in un bagnetto termostato alla temperatura di 60°C in modo da inattivare eventuali enzimi che potrebbero competere con la reazione per la quantificazione del colesterolo.

Per la determinazione del quantitativo di colesterolo all'interno della cellula si costruisce una scala standard con 0, 2, 5, 10, 20 e 30µl di colesterolo ad una concentrazione di 0,1µg/µl, portando ad un volume finale di 50µl con l'aggiunta di reaction buffer 5X. I campioni sono aggiunti ad un volume di 50µl e la lettura di tipo fluorimetrico (eccitazione a 535 ed emissione a 585) viene effettuata utilizzando l'Amplex Red Cholesterol assay Kit (molecular Probe Eugene, OR). I risultati ottenuti sono corretti sui mg di proteine presenti all'interno dei pozzetti calcolati mediante la metodica di determinazione proteica.

### ***Determinazione del contenuto proteico***

Un'aliquota dei lisati cellulari preparati secondo la metodologia precedentemente descritta viene addizionata di 10µl di SDS e portata ad un volume di 200µl con acqua deionizzata. Ai campioni viene aggiunta 1ml di soluzione A + B in rapporto 50:1, per un tempo di incubazione di 10 min in bagnetto termostato a 37° C.

Soluzione A: 20g di carbonato di sodio, 4g di soda e 0,2g di tartrato di sodio (o 0,237g di tartrato biidratato di sodio) in 1L di acqua deionizzata.

Soluzione B: 5g di solfato rameico in 1L di acqua deionizzata.

Al termine dei 10 min di incubazione vengono aggiunti 100µl di reattivo di Folin diluito in acqua deionizzata (rapporto 1:1), ottenendo un'intensità colorimetrica dei campioni proporzionale al quantitativo proteico presente. Dopo 20min di incubazione i campioni la lettura avviene mediante spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 550nm, e la quantificazione delle proteine presenti si ricava dai valori di assorbenza di una curva standard di albumina.

La scala standard di albumina è costituita da campioni in doppio di 10, 25, 50, 100 e 140µl di albumina, a cui vengono aggiunti 50µl di una soluzione di acido colico e reaction buffer, 10µl di SDS, portando le soluzioni al volume finale di 200µl con acqua deionizzata.

Il contenuto proteico si ricava dai valori di assorbanza della scala standard divisi per i  $\mu\text{g}$  dello standard utilizzato, e dalla media dei valori ottenuti si ricava il valore di  $\epsilon$ . L'assorbanza dei singoli campioni viene divisa per  $\epsilon$ , per il volume di campione prelevato all'inizio dell'esperimento e moltiplicata per il volume totale del pozzetto, ottenendo così la quantità di proteine presenti nei singoli pozzetti.

### ***Analisi statistica dei dati***

I risultati sono stati riportati come media  $\pm$  DS. I dati sono stati analizzati con 2-tailed Student's t Test e 2-way ANOVA, seguita da un'analisi mediante l'uso di Bonferroni test con l'utilizzo di GraphPad Prism Software.

## **Studio ACAT2**

### ***Animali***

Topi maschi C57Bl/6 (WT) e topi maschi double knockout LXR $\alpha/\beta$  (LXR DOKO) creati su un background genetico puro di topi C57Bl/6, sono stati trattati per 4 settimane mediante iniezione per due volte a settimana, con:

- Oligonucleotidi antisenso (ASO) aventi come target specifico il gene epatico dell'ACAT2 (ASO6) – 25 mg/kg
- ASO muniti di una sequenza antisenso controllo (Ctrl) – 25 mg/kg

Gli animali sono 7 per gruppo, e per le 4 settimane antecedenti l'inizio dell'esperimento e per tutta la sua durata, sono stati alimentati con una dieta al 10% SAT (soluzione salina) e allo 0.2% di colesterolo (w/w). Gli animali sono stati tenuti a digiuno per 4 ore prima del sacrificio.

### ***Oligonucleotidi antisenso (ASO)***

Gli oligonucleotidi 20-mer fosforotati contengono gruppi 2'-O-metossietil alla posizione 1, 5, 15 e 20 con sequenze aventi come bersaglio l'ACAT2. Le sequenze di questi ASOs sono le seguenti:

- ASO6: 5'-TTCGGAAATGTTGCACCTCC-3'
- ASO controllo: 5'-GTCGCTCAACATCTGAATCC-3'

L'ASO controllo non è complementare alla sequenza ACAT2 e non è ibridizzato con uno specifico gene target. Gli oligonucleotidi antisenso sono stati ottenuti da ISIS Pharmaceuticals, Carlsbad, CA, USA per mezzo di una collaborazione scientifica.

### ***Studio sul potenziale di efflusso a sieri***

- **Quantificazione dell'efflusso cellulare di colesterolo mediato da diffusione passiva e dalla proteina ABCA1**

L'efflusso attraverso diffusione passiva viene misurato in cellule macrofagiche di origine murina, J774 in condizioni controllo; mentre per valutare l'efflusso mediato dalla proteina di membrana ABCA1, vengono utilizzate lo stesso tipo di cellule macrofagiche (J774) trattate con cpt-cAMP, composto in grado di stimolare la proteina ABCA1 (Bortnick, 2000). Le cellule crescono in RPMI al 10% di FCS, incubate a 37°C, al 5% CO<sub>2</sub>, al momento dell'uso vengono seminate in piastre da 24 pozzetti e utilizzate all'80-90% di confluenza. Dopo 24 h dalla semina, il monostrato cellulare viene lavato con PBS e le cellule vengono incubate per altre 24 h con medium contenente colesterolo marcato con 3H (2μCi/ml), l'1% di FCS e 2μg/ml di inibitore dell'ACAT. Al termine della fase di marcatura, le cellule lavate con PBS, sono sottoposte alla fase di equilibramento in cui al monostrato viene aggiunto del medium contenente lo 0.2% di BSA, con la presenza o meno di cpt-cAMP 0.3mM per 18 h. Le cellule al tempo zero vengono lavate, essiccate e estratte con 2-propanolo, in modo da calcolare il quantitativo di marcato presente nel monostrato cellulare; mentre nelle altre cellule alle diverse condizioni vengono aggiunti gli accettori di colesterolo in grado di

promuovere l'efflusso, in questo caso abbiamo la presenza di siero all'1% (v/v) e la fase di efflusso è della durata di 4 h. la radioattività nel surnatante è misurata al  $\beta$  counter attraverso l'aggiunta del liquido di scintillazione. L'efflusso di colesterolo è calcolato come media percentuale tra i cpm del medium prelevato alla 4 h e cpm ricavati dalle cellule che non hanno ricevuto gli accettori, ossia al tempo zero. La quantificazione dell'efflusso cellulare mediato da ABCA1 viene calcolata come sottrazione tra la percentuale di colesterolo efflusa da cellule macrofagiche stimulate dal cpt-cAMP e quella delle cellule in condizioni basale, ossia non stimulate.

- **Quantificazione dell'efflusso di colesterolo mediato da SR-B1**

L'efflusso di colesterolo mediato da SR-B1 è stato misurato in cellule FU5AH (epatomi di ratto), che esprimono in condizioni basali alti livelli del trasportatore. Le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti, in medium DMEM addizionato del 5% di FCS per 2 giorni, e marcate con 2 $\mu$ Ci/ml di 3H-colesterolo per 24 ore in medium all'1% di FCS e 2 $\mu$ g/ml dell'inibitore dell'ACAT, in modo da assicurarsi che tutto il colesterolo marcato sia presente sottoforma di FC. Successivamente, le cellule vengono incubate per 18 ore con DMEM allo 0.2% di BSA, per poi essere esposte alla presenza di accettori, siero all'1%, per 4 ore. Al termine della fase di equilibrio le cellule che non ricevono l'accettore, vengono lavate con PBS, addizionate di 2-propanolo ed estratte per conoscere la loro quantità intracellulare di colesterolo marcato. La radioattività presente nel surnatante prelevato viene quantificata mediante l'uso del  $\beta$ counter, e l'efflusso di colesterolo calcolato come rapporto percentuale tra i cpm del medium e i cpm trovati nelle cellule al tempo zero, ossia quelle cellule che non hanno ricevuto l'accettore.

***Analisi statistica dei dati***

Le significatività statistiche sono state determinate per ogni gruppo di valori mediante il test non parametrico di Mann Whitney, utilizzando il software di statistica, in GraphPad Prism. Le variazioni osservate sono state ritenute significative a partire da  $p < 0,05$ .

## **Studio manidipina/delapril**

### ***Animali***

Femmine di topo apoE knock out (B6.129P2-Apoetm1Unc/J, Charles River Laboratories) di 10 settimane d'età sono state suddivise in tre gruppi alimentati per 12 settimane con dieta standard contenente o meno l'associazione manidipina/delapril:

- Topi controllo (dieta standard) (n=8)
- Topi trattati con manidipina/delapril ~ 16/48 mg/kg/die (dieta supplementata con manidipina/delapril 0,02/0,06 % ) (n=8)
- Topi trattati con manidipina/delapril ~ 40/120 mg/kg/die (dieta supplementata con manidipina/delapril 0,05/0,15 % ) (n=8)

Le femmine, come dimostrato in letteratura, sono scelte perché presentano una lesione aterosclerotica più estesa rispetto ai topi maschi (Bellosta et al. 1995).

Al termine delle 12 settimane di trattamento farmacologico gli animali sono stati sacrificati con eccesso di anestetico.

### ***Valutazione della lesione aterosclerotica***

In seguito a perfusione con PBS e paraformaldeide al 4% (PFA), cuore e aorta toracica sono stati rimossi e preparati per l'analisi istologica e la quantificazione del contenuto lipidico. La metà superiore del cuore comprendente 1 mm dell'aorta prossimale é stata conservata overnight in una soluzione al 4% di PFA e 15% di saccarosio, per essere congelata e sezionata il giorno successivo: sezioni trasversali dell'aorta ascendente (20 µm) e delle valvole cardiache (10 µm) sono stati fissati su vetrini gelatinizzati. I lipidi nelle sezioni delle valvole cardiache sono stati evidenziati tramite colorazione con Oil Red O (Sigma) e la lesione quantificata con metodi computerizzati.

### ***Accumulo di colesterolo nell'aorta***

La restante porzione dell'aorta toracica é stata lavata con PBS freddo, essiccata, pesata, omogenata e sottoposta a estrazione con solventi (cloroformio/metanolo 2:1). Il colesterolo totale (libero ed esterificato) ed il colesterolo libero sono stati quantificati con metodo colorimetrico enzimatico (Slavo Diagnostic). Il contenuto di colesterolo estere presente nell'aorta é stato calcolato sottraendo il valore di colesterolo libero ottenuto al valore del colesterolo totale.

### ***Valutazione immunoistochimica delle molecole di adesione***

L'espressione delle molecole d'adesione (I-CAM1 e V-CAM1) é stata valutata nelle sezioni tissutali ottenute dalle valvole aortiche e dalla prima porzione dell'aorta ascendente. Il tessuto é stato lavato con PBS freddo, trattato per 20 minuti con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3%) e bloccato per 20 minuti con 1,5% di siero equino. Successivamente le sezioni tissutali sono state incubate per 1 ora, a temperatura ambiente, con anticorpo policlonale di capra (diluito 1:20 in PBS) in grado di legarsi alla porzione carbossiterminale della I-CAM1 e V-CAM1 murine. Dopo lavaggio, i campioni sono stati esposti per 30 minuti ad anticorpo equino anti IgG di capra diluito (1:200) in PBS contenente l'1,5% di siero equino.

La reattività degli anticorpi per le due molecole d'adesione é stata amplificata mediante ABC kit (Vectors Laboratories) per 30 minuti e successivamente quantificata per mezzo del complesso AEC (Sigma) come substrato.

### ***Quantificazione dei livelli plasmatici di interleuchina-6***

Immediatamente dopo il sacrificio, dagli animali é stato prelevato il sangue per la preparazione del plasma, e la quantificazione dell'IL-6 plasmatica é stata effettuata mediante saggio ELISA per l'IL-6 murina tramite OptEIA Set (Pharmigen).



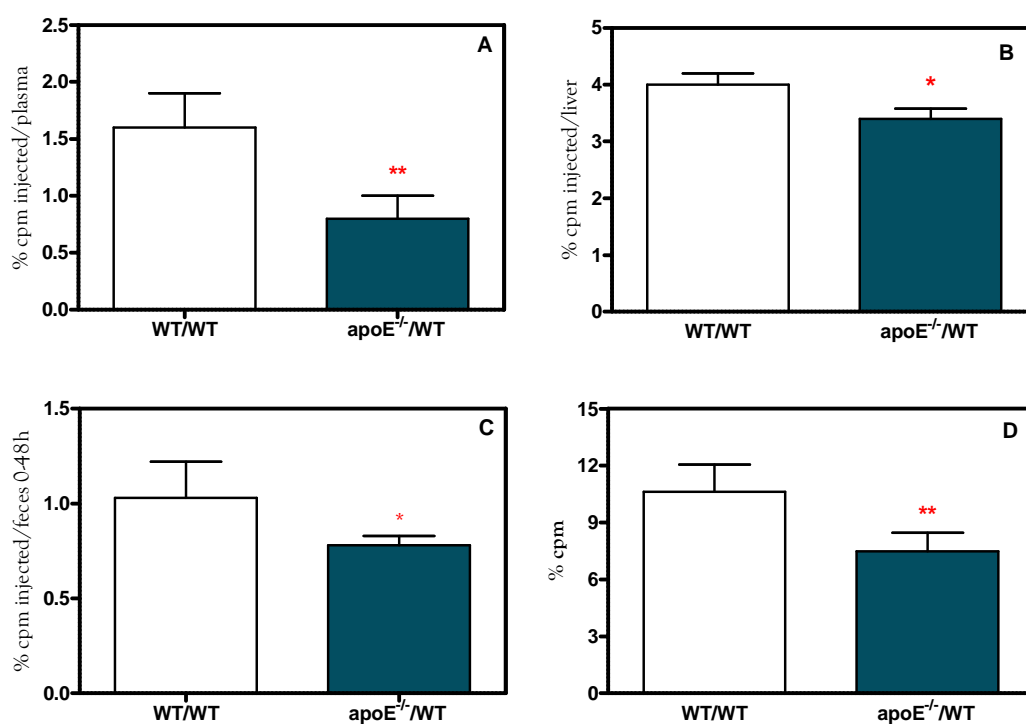
### ***Analisi statistica dei dati***

I risultati degli esperimenti sono riportati come media  $\pm$  DS. La significatività statistica è stata determinata dal test di Student e dal test ANOVA, mediante l'utilizzo di GraphPad Prism Software. Le variazioni osservate sono state ritenute significative a partire da  $p < 0,05$ .

## *Risultati*

## Ruolo dell'apoE sull'RCT macrofagico in vivo

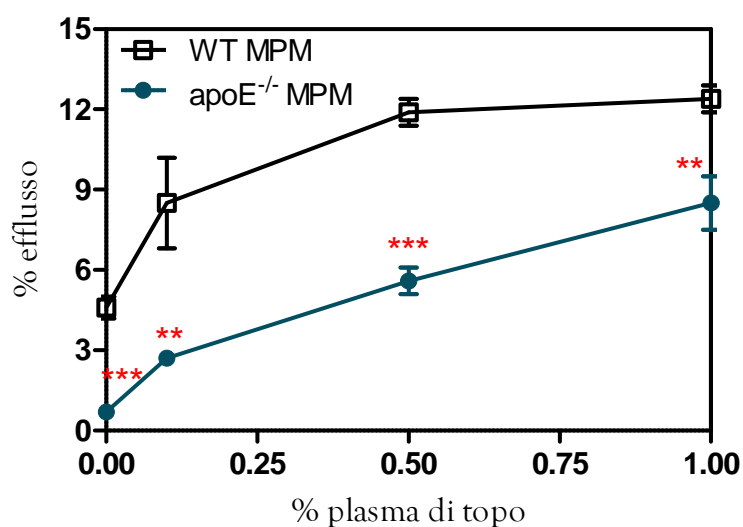
Il trasporto inverso di colesterolo in vivo è stato valutato in topi controllo riceventi macrofagi WT e knockout per l'apoE (WT/WT e apoE<sup>-/-</sup>/WT). Come si nota dai grafici presenti in Figura 1, l'assenza dell'apoE nel macrofago causa una riduzione significativa del contenuto di [<sup>3</sup>H]-colesterolo nel plasma (<51%,A), nel fegato (<17%,B) e nelle feci (<25%,C). La quantità totale di colesterolo radiomarcato mobilizzato dai macrofagi negli animali apoE<sup>-/-</sup> mostra una riduzione del 29% rispetto ai topi WT (Figura 1.D)(Zanotti et al.).



**Figura 1** La mancanza dell'apoE nel macrofago riduce l'RCT macrofagico in vivo. I livelli di colesterolo triziato ([<sup>3</sup>H]-colesterolo) sono stati quantificati nel plasma (A), nel fegato (B) e nelle feci (C). Il contenuto di [<sup>3</sup>H]-colesterolo nel plasma è stato determinato mediante conta diretta al  $\beta$ counter. Campioni di tessuto epatico e feci sono stati estratti con il metodo della Bligh and Dyer, per isolare gli steroli neutri. L'RCT totale (D) è stato calcolato come la somma della radioattività trovata nel plasma, fegato e feci. I risultati sono espressi come percentuale di [<sup>3</sup>H] iniettato  $\pm$  DS; il numero di animali sono 5 per gruppo. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs topi WT/WT.

## Valutazione del ruolo dell'apoE sull'efflusso di colesterolo nel macrofago

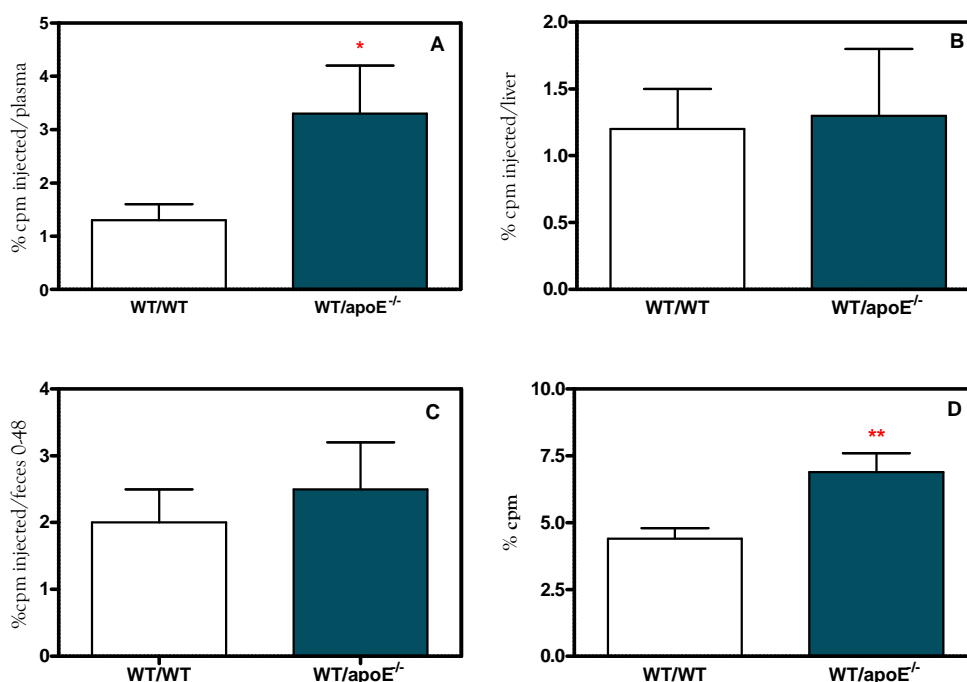
Al fine di individuare il ruolo dell'apoE nel mediare l'efflusso di colesterolo a livello del macrofago, è stata confrontata la capacità degli MPM provenienti da topi WT e apoE<sup>-/-</sup> nel modulare l'efflusso a plasma di topi WT. Le cellule, esposte a dosi crescenti dell'accettore plasmatico per 24h, hanno manifestato una differente capacità nel promuovere tale processo. Dalla Figura 2 si nota che MPM WT sono in grado di rilasciare una percentuale maggiore di colesterolo, anche in assenza dell'accettore, comparati agli MPM di topi apoE<sup>-/-</sup> (Zanotti et al.).



**Figura 2. Riduzione dell'efflusso di colesterolo in MPM deficitarii dell'apoE.** Le cellule provenienti dal peritoneo di topi WT e apoE<sup>-/-</sup> trattati con tioglicolato sono state seminate, addizionate di AcLDL (25µg/ml), radiomarcate con [<sup>3</sup>H]-colesterolo per 24h ed equilibrate in medium contenente albumina per 18h. Le cellule sono state infine esposte ad una percentuale crescente di plasma di topi WT, promuovendo un efflusso per 24h. I risultati sono espressi come rapporto percentuale tra i cpm del medium e i cpm dei To ± DS, da cellule trattate in triplo. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs MPM dei WT.

## Ruolo della delezione dell'apoE sistemica nell'RCT macrofagico in vivo

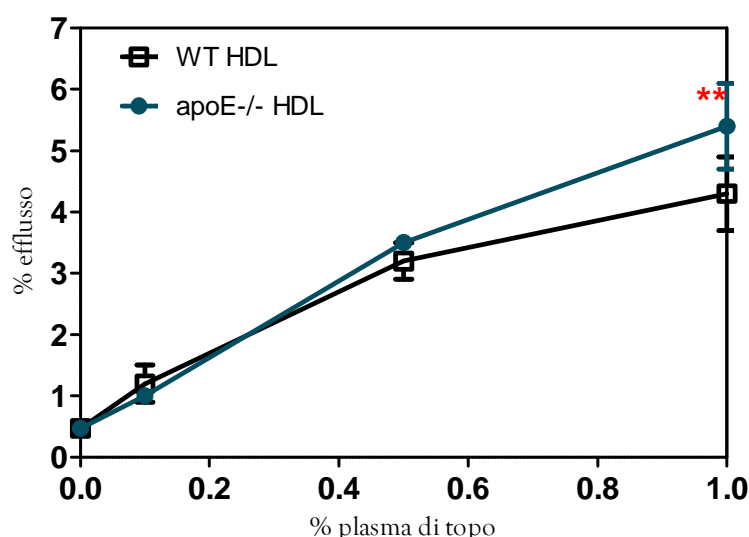
L'RCT in vivo è stato valutato su topi WT e topi apoE<sup>-/-</sup> riceventi entrambi macrofagi WT, in modo da caratterizzare il ruolo dell'apoE presente a livello sistemico su tale processo. Come dimostrato dai grafici in Figura 3, gli animali deficitari dell'apolipoproteina E hanno un incremento del contenuto di [<sup>3</sup>H]-colesterolo nel plasma di 2.5 volte superiore rispetto ai topi controllo, dopo 48h dall'iniezione peritoneale di MPM WT (Figura 3.A). La quantità di colesterolo marcato nel fegato e nelle feci, invece, non differisce tra i due gruppi di animali (Figura 3.B e 3.C). L'RCT totale nei topi WT/apoE<sup>-/-</sup> è significativamente più alto rispetto ai topi WT/WT (Figura 3.D).



**Figura 3.** L'assenza dell'apoE a livello sistemico non varia l'RCT macrofagico in vivo. Il contenuto di [<sup>3</sup>H]-colesterolo, derivante dai macrofagi, è stato quantificato nel plasma (A), nel fegato (B) e nelle feci (C). La determinazione della radioattività nei diversi distretti è stata descritta in Fig.1. L'RCT totale è stato calcolato come la somma della radioattività presente nel plasma, fegato e feci. I risultati sono espressi come percentuale di [<sup>3</sup>H] iniettato  $\pm$  DS; animali per gruppo pari a 5. \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs topi WT/WT.

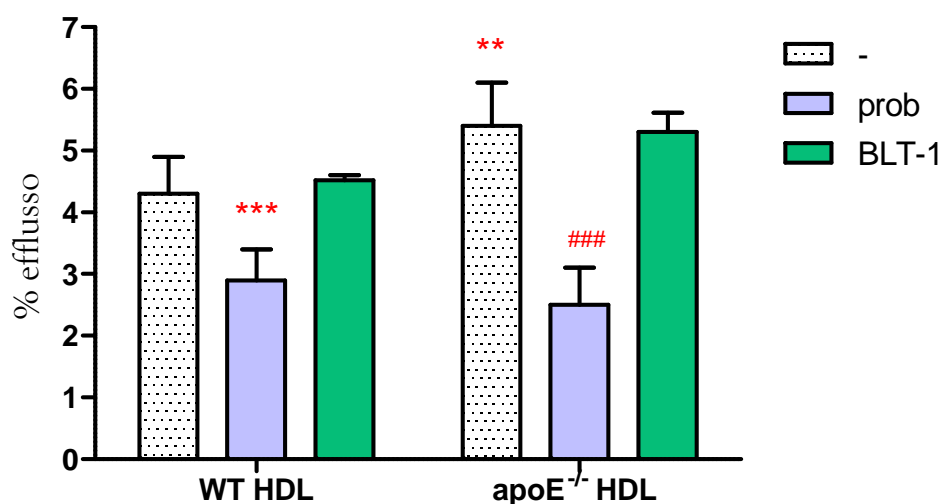
## Valutazione del ruolo dell'apoE sistemica nell'efflusso cellulare di colesterolo

In seguito alla separazione della frazione HDL dal plasma intero di topi WT e apoE<sup>-/-</sup>, si è andati a valutare come questa componente plasmatica sia in grado di modulare il processo d'efflusso in macrofagi WT. Gli MPM di topi WT sono stati esposti a dosi crescenti di HDL per 6h. Come é possibile notare nella **Figura 4**, si evince che la frazione del colesterolo HDL proveniente da topi apoE<sup>-/-</sup> promuove un efflusso uguale o lievemente superiore a quello promosso dalle HDL di topi WT (Zanotti et al.).



**Figura 4.** La mancanza dell'apoE a livello sistemico non influenza il potenziale di efflusso delle HDL. Gli MPM WT sono stati arricchiti di AcLDL (25µg/ml), radiomarcati con [<sup>3</sup>H]-colesterolo per 24h ed equilibrati in medium contenente albumina per 2h. A questa fase è seguito il periodo di efflusso verso concentrazioni crescenti di HDL isolate da topi WT e apoE<sup>-/-</sup>, per la durata di 6h. I valori sono espressi come rapporto percentuale tra i cpm del medium e i cpm dei To ± DS, da cellule trattate in triplo. \*\*p<0,01 vs HDL WT.

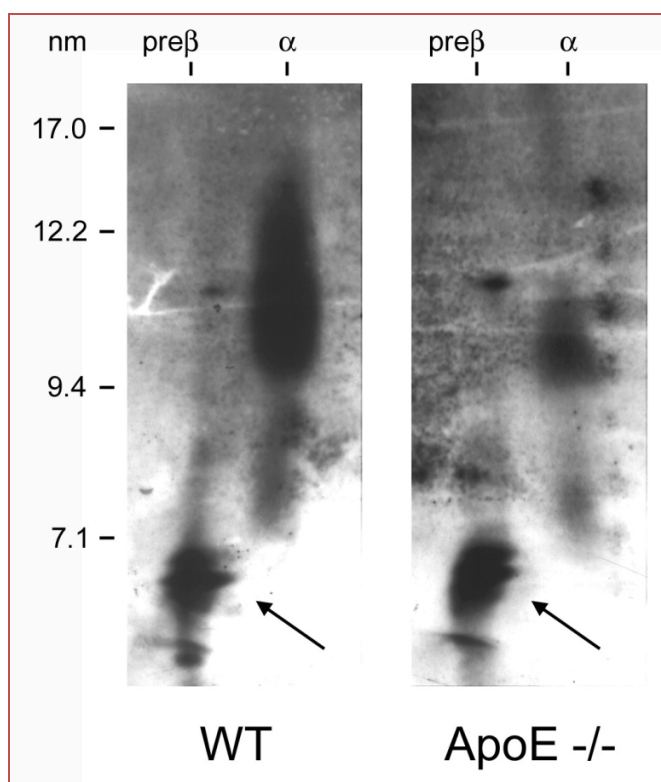
Dal grafico riportato qui di seguito (Figure 5) è possibile osservare come macrofagi trattati con inibitori specifici di ABCA1 e SR-B1, possono mostrare meccanismi di efflusso diversi, in base alla diversa composizione delle frazioni HDL di topi WT e apoE<sup>-/-</sup>. Le cellule esposte ad HDL provenienti da topi apoE<sup>-/-</sup>, dopo trattamento con probucolo, mostrano un'inibizione dell'efflusso ABCA1 mediato maggiore rispetto all'inibizione prodotta in cellule esposte ad HDL di topi WT. Si ottiene così una riduzione maggiore nella capacità di rilasciare il colesterolo verso ligandi preferenziali del trasportatore ABCA1, e l'efflusso difatti è inibito al 55% dalla frazione HDL di topi apoE<sup>-/-</sup> rispetto al 31% prodotto dalla frazione HDL dei topi WT. Al contrario, il trattamento con BLT-1 non presenta differenze tra le diverse condizioni (Zanotti et al.).



**Figure 5. Influenza di ABCA1 e SR-B1 sul potenziale di efflusso delle HDL.** Gli MPM trattati nelle identiche condizioni descritte in **Figura 4**, durante l'equilibramento sono stati addizionati di probucolo e BLT-1 per 2h, per poi essere incubate con HDL all'1% per 6h. L'esperimento è stato condotto in tripli, testando 3 campioni di HDL per gruppo. L'efflusso è stato misurato come rapporto percentuale tra i cpm del medium e i cpm dei To  $\pm$  DS. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs HDL WT; ### $p > 0,001$  vs HDL di topi apoE<sup>-/-</sup>.

## Analisi elettroforetica della distribuzione delle HDL nel plasma di topo wild type e knockout per l'apolipoproteina E

Attraverso un'analisi elettroforetica di tipo bidimensionale è stato possibile mettere in evidenza la diversa distribuzione delle HDL nel plasma di topi WT e apoE<sup>-/-</sup>. Come mostrato in **Figura 6**, topi apoE<sup>-/-</sup> presentano una porzione preβ delle stesse dimensioni di quella trovata in topi WT, al contrario la porzione α è significativamente ridotta.



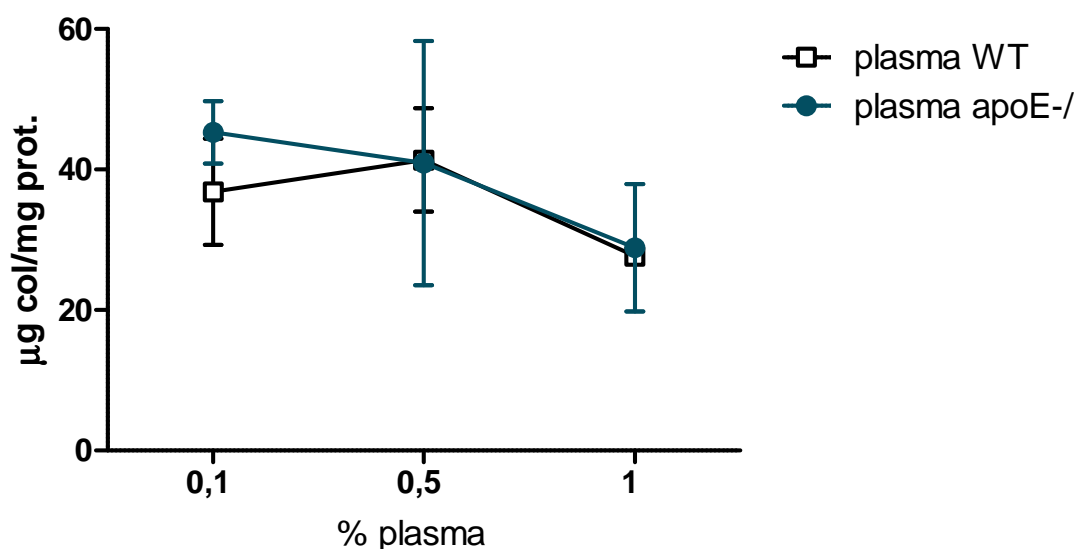
**Figura 6.** La distribuzione delle sottoclassi delle HDL è alterata in topi apoE<sup>-/-</sup>. Le HDL sono state separate mediante un'elettroforesi bidimensionale su gel di agarosio e a cui ha fatto seguito una elettroforesi su gel di poliacrilammide non denaturato. L'immunodetection è stata effettuata con un antimouse apoA1. La figura riportata appartiene ad un solo animale ed è rappresentativa di altri 4 topi. Le frecce indicano la banda della porzione preβ delle HDL nei topi WT e apoE<sup>-/-</sup>.



## Accumulo di colesterolo in macrofagi WT esposti a plasma WT e apoE<sup>-/-</sup>

É stata valutata inoltre la capacità del plasma WT e apoE<sup>-/-</sup> di cedere colesterolo alla cellula. Macrofagi provenienti da topi WT sono stati esposti a concentrazioni crescenti di plasma WT e apoE<sup>-/-</sup>, per poter differenziare la capacità di influsso del plasma di animali deficitarii dell'apoE rispetto al plasma di topi controllo.

Dalla figura riportata di seguito (Figura 7) si evince che l'influsso lipidico promosso dal plasma apoE<sup>-/-</sup> é del tutto comparabile all'influsso sviluppato dal plasma di topi WT.



**Figura 7. Accumulo di colesterolo in macrofagi caricati con AcLDL.** Gli MPM seminati in piastre da 12 pozzetti sono trattati con AcLDL alla concentrazione di 25µg/ml per 24h, per poi essere equilibrati con medium allo 0,2% di BSA per 18h. Le cellule sono infine esposte a concentrazioni crescenti di plasma WT e apoE<sup>-/-</sup> per 6h. Sui lisati cellulari è stato determinato l'accumulo di colesterolo secondo metodica descritta nel paragrafo Materiali e Metodi.

## **Valutazione dell'efflusso di colesterolo sul siero di topi wild type e double knockout LXR $\alpha$ / $\beta$ dopo trattamento con ASO6**

Dai risultati ottenuti precedentemente, sui topi WT e LXR $\alpha$ / $\beta$  double knockout (LXR DOKO) in cui viene down-regolata l'attività dell'enzima ACAT2 a livello epatico, è stato osservato un incremento dell'espressione della proteina ABCA1 nel fegato, con conseguente aumento della sintesi delle HDL e una modificazione nella distribuzione delle loro sottoclassi.

In particolare, nei topi WT il trattamento con ASO6 non varia la porzione pre $\beta$  delle HDL, mentre porta alla formazione di  $\alpha$ HDL più grandi. Diverso è l'andamento nei topi LXR DOKO trattati con ASO6, dove si osserva un incremento della porzione pre $\beta$  e una distribuzione della porzione  $\alpha$  verso particelle più piccole.

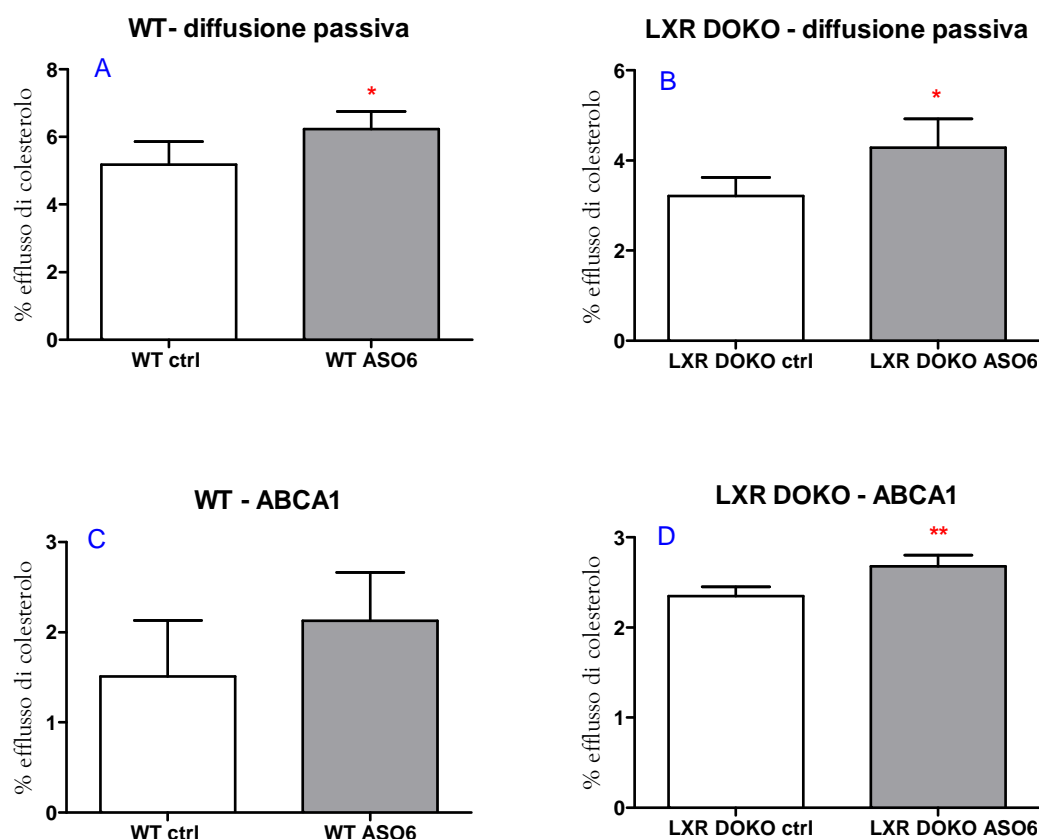
Vista la diversa distribuzione delle sottopopolazioni delle HDL nei due gruppi di animali, sono stati valutati i diversi meccanismi di efflusso di colesterolo a sieri di topi WT e LXR DOKO trattati o meno con ASO6.

### ***Efflusso di colesterolo per diffusione passiva e mediato da ABCA1***

L'efflusso di colesterolo è stato condotto su macrofagi murini J774, in condizioni basali per studiare la diffusione passiva, e trattati con AMP ciclico (cAMP) l'efflusso di colesterolo mediato da ABCA1.

Il potenziale di efflusso a sieri di topi WT e LXR DOKO, trattati con ASO6, mostra un incremento del rilascio di colesterolo nel processo di diffusione passiva, rispetto al siero degli stessi animali in cui non vi è una down-regulation dell'ACAT2 (Figura 8 A e B).

Nel meccanismo di efflusso mediato da ABCA1, il trattamento con ASO6 non altera la capacità del siero dei topi WT nel promuovere il rilascio di colesterolo dalle cellule (Figura 8 C). Al contrario il siero dei topi LXR DOKO trattati con ASO6 é in grado di mediare un efflusso di colesterolo maggiore rispetto ai sieri degli animali ricevanti l'ASO controllo (Figura 8 D).

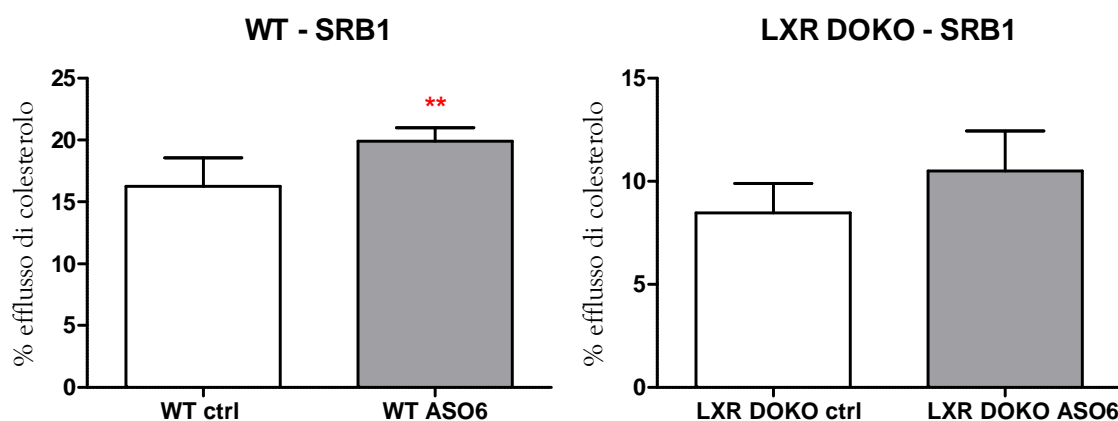


**Figura 8. Effetto della down-regulation dell'ACAT2 sull'efflusso di colesterolo mediato da ABCA1.** Le cellule J774 dopo la semina, sono state incubate con medium contenente [ $^3$ H]-colesterolo ( $2\mu\text{Ci/ml}$ ), FCS all'1% e ACAT inibitore ( $2\mu\text{g/ml}$ ) per 24h. Sono state equilibrate in un medium allo 0.2% di BSA e cAMP ( $0,3\text{mM}$ ) per 18h ed esposte all'1% di sieri di topi WT e LXR DOKO trattati o meno con ASO6, per 4h. I valori sono espressi come rapporto percentuale tra i cpm del medium e i cpm dei To. I risultati sono espressi come media  $\pm$  SEM per gruppo. Mann Whitney test \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ .

### ***Efflusso di colesterolo mediato da SR-B1***

Il potenziale d'efflusso di colesterolo dei sieri di topi WT e LXR DOKO è stato valutato su cellule FU5AH (epatomi di ratto), che esprimono in condizioni basali alti livelli della proteina SR-B1.

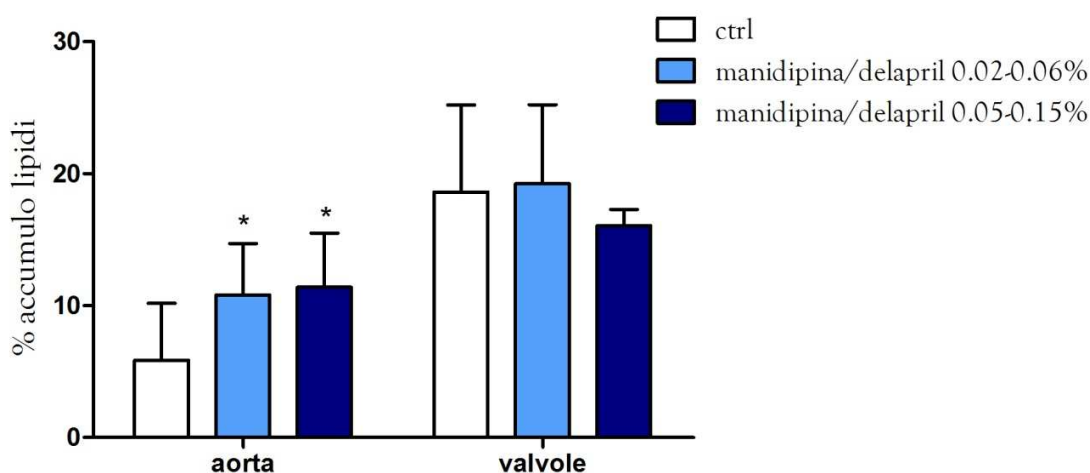
Come si nota dalla **Figura 9**, nelle cellule esposte a siero di topo WT, in cui vi è una down-regulation epatica dell'enzima ACAT2, si ha un aumento dell'efflusso di colesterolo rispetto alle cellule incubate con siero di topo controllo. Invece, il trattamento con ASO6 in topi LXR DOKO non ha apportato alcuna variazione del potenziale d'efflusso a sieri mediato da SR-B1.



**Figura 9. Effetto della down-regulation dell'ACAT2 sull'efflusso di colesterolo mediato da SR-B1.** Le cellule FU5AH dopo la semina, sono state incubate con medium contenente [ $^3$ H]-colesterolo (2 $\mu$ Ci/ml), l'1% di FCS e ACAT inibitore (2 $\mu$ g/ml) per 24h. Sono state equilibrate in un medium allo 0.2% di BSA per 18h ed esposte all'1% di sieri di topi WT e LXR DOKO trattati o meno con ASO6, per 4h. I valori sono espressi come rapporto percentuale tra i cpm del medium e i cpm dei To. I risultati sono espressi come media  $\pm$  SEM per gruppo. Mann Whitney test \*\*p<0,01.

## Valutazione dell'accumulo dei lipidi nell'aorta e nelle valvole cardiache

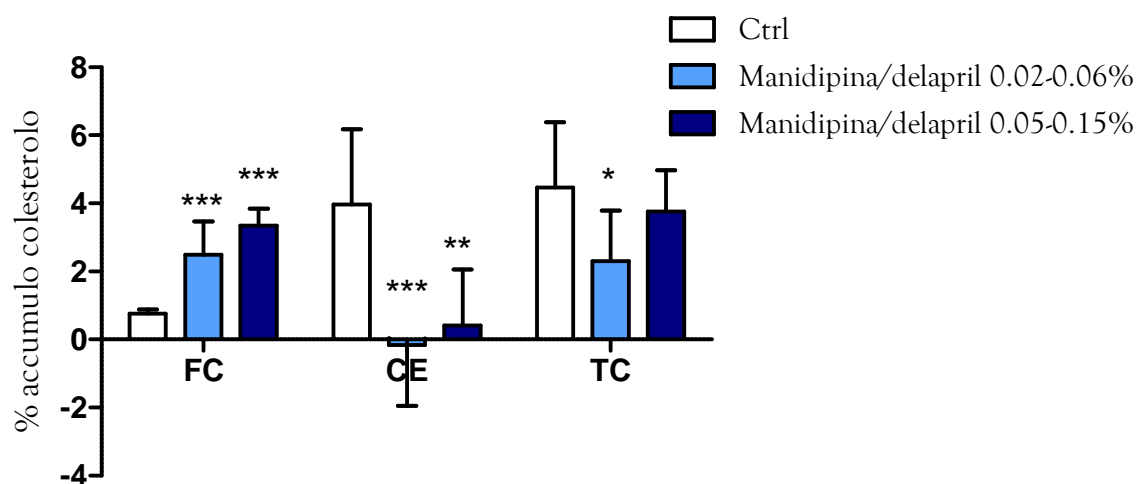
L'accumulo dei lipidi è stato visualizzato a livello delle valvole cardiache e del primissimo tratto dell'aorta ascendente. Come si osserva in **Figura 10**, le percentuali esprimenti l'accumulo lipidico nelle valvole indicano una tendenza ad un ridotto contenuto di lipidi nei topi trattati con il dosaggio più alto dell'associazione manidipina/delapril (0,05-0,15%), rispetto ai topi trattati con il solo veicolo. Questo andamento non è però statisticamente significativo. Al contrario, nelle sezioni da aorta è stato osservato un significativo accumulo dei lipidi in entrambi i gruppi di animali ricevanti l'associazione dei farmaci, rispetto al gruppo controllo.



**Figura 10. Quantificazione del contenuto di lipidi nelle valvole cardiache e nell'aorta.** Gli organi prelevati in seguito al sacrificio, la metà superiore del cuore comprendente 1mm di tratto aortico, sono stati conservati in una soluzione di paraformaldeide al 4% (PFA) e saccarosio al 15%, overnight. Il giorno successivo, sono stati congelati e le sezioni trasversali dell'aorta ascendente (20µm) e delle valvole (10µm) sono state fissate su vetrini gelatinizzati, mediante l'uso del criostato. I lipidi presenti sono stati valutati mediante colorazione Oil Red O e la lesione quantificata con metodi computerizzati. \* $p < 0,05$  vs ctrl.

## Profilo lipoproteico nell'aorta toracica

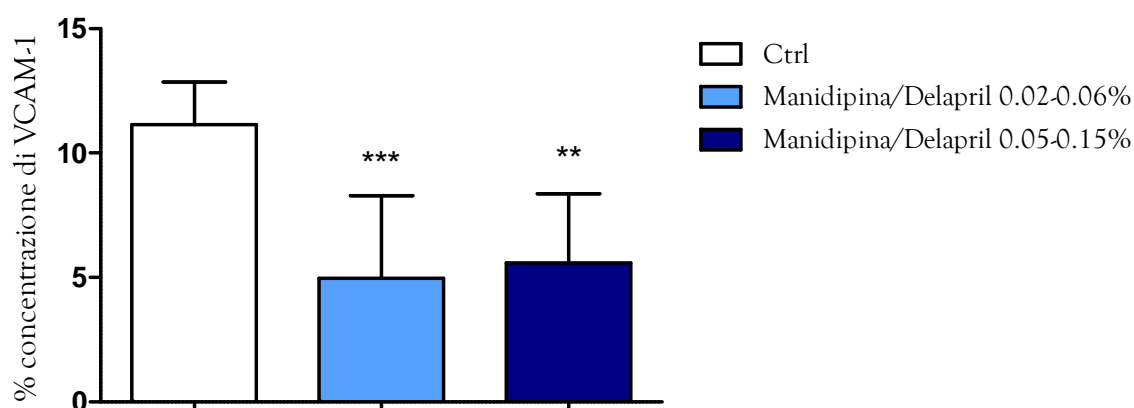
È stato valutato il contenuto di colesterolo nell'aorta toracica. Dalla **Figura 11**, si nota che i livelli di colesterolo libero (FC) aumentano in modo significativo all'aumentare della dose di manidipina/delapril somministrata. Allo stesso tempo, si osserva una riduzione marcata nel contenuto di colesterolo estere (CE), che risulta maggiore nei topi a cui è stato somministrato il dosaggio più basso dei farmaci (0.02-0.06%). Nelle diverse sezioni dei tratti interessati, è possibile notare come la percentuale di colesterolo totale (TC) sia significativamente ridotta negli animali ricevanti l'associazione manidipina/delapril al dosaggio inferiore.



**Figura 11. Contenuto di colesterolo nell'aorta toracica.** Il tratto dell'aorta toracica viene essiccato, pesato, omogenato e sottoposto ad estrazione con una miscela estraente (cloroformio/metanolo 2:1). Il colesterolo totale e il colesterolo libero sono stati quantificati attraverso un metodo colorimetrico, mentre il contenuto di colesterolo estere è stato calcolato sottraendo il valore del colesterolo libero dal totale. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs ctrl.

## Espressione di VCAM-1 nelle valvole cardiache e nell'aorta ascendente

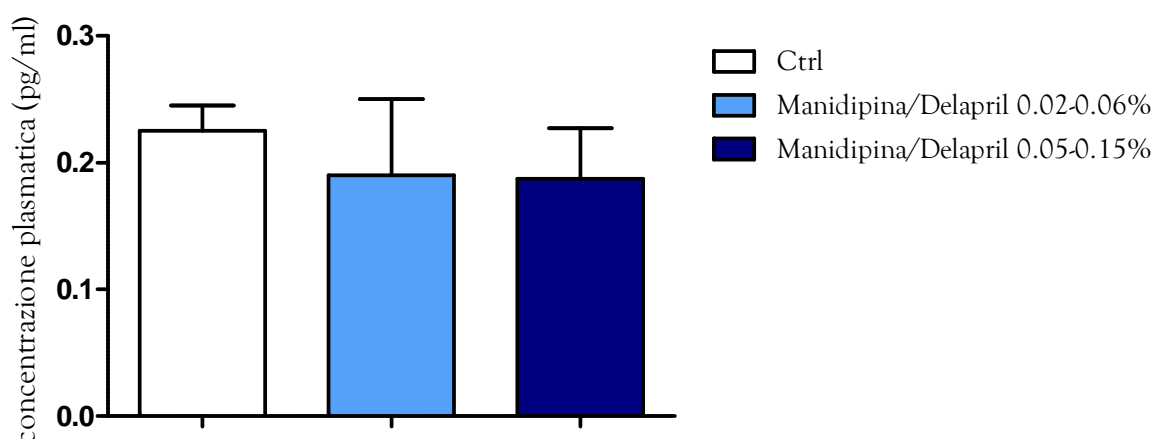
Sulle sezioni tissutali delle valvole cardiache e della prima porzione del tratto dell'aorta ascendente si nota una significativa riduzione dell'espressione della molecola di adesione VCAM-1 nei due gruppi trattati con l'associazione manidipina/delapril, rispetto al gruppo di animali controllo (Figura 12).



**Figura 12. Espressione di VCAM-1 nelle valvole e nell'aorta ascendente.** Le sezioni tissutali presenti sui vetrini gelatinizzati sono state trattate con  $H_2O_2$  (0,3%) per 20 min e con siero equino (1,5%) per altri 20 min. Al termine hanno subito un periodo di incubazione di 1h con anticorpo policlonale di capra diluito 1:20, a temperatura ambiente. I campioni vengono poi lavati ed incubati per 30 min con l'anticorpo equino anti IgG di capra diluito 1:200 in PBS contenente l'1.5% di siero equino. La reattività degli anticorpi è stata misurata con ABC kit e quantificata per mezzo di AEC kit come substrato. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs ctrl.

## Quantificazione plasmatica dell'interleuchina 6 (IL-6)

Come si può osservare dalla figura riportata di seguito (Figura 13), andando a quantificare la concentrazione dell'interleuchina 6 (IL-6) nel plasma non si osservano delle differenze tra i diversi gruppi di animali, ma è possibile notare un trend di diminuzione dei valori passando dal gruppo controllo al gruppo di topi trattati con l'associazione manidipina/delapril, senza però raggiungere una significatività statistica.



**Figura 13. Concentrazione plasmatica dell'IL-6.** Parte del sangue prelevato durante il sacrificio degli animali è stato utilizzato per valutare i livelli di IL-6 nei topi trattati o meno con l'associazione dei farmaci, mediante Kit ELISA. Per l'uso del kit sono state seguite le indicazioni riportate sul manuale di istruzione.



## *Discussione*

## Discussione 1: Studio ApoE

Il ruolo ateroprotettivo dell'apolipoproteina E è ormai ben documentato in diversi lavori, dove viene dimostrato l'impatto della sua delezione sullo sviluppo dell'aterosclerosi. La sua attività è in parte legata alla modulazione del profilo lipoproteico e alla sua capacità di promuovere l'efflusso di colesterolo dalle cellule (Langer et al. 2000),(Mazzone et al. 1994). Mentre il primo effetto è riconducibile all'apoE sistemica, il secondo è attribuito all'apoE espressa a livello macrofagico (Zanotti et al. 2010). Da risultati ottenuti da un precedente lavoro, abbiamo notato come topi apoE<sup>-/-</sup> riceventi macrofagi apoE<sup>-/-</sup> mostrano un RCT compromesso, rispetto a topi WT riceventi macrofagi WT. Nel lavoro si è cercato di individuare il ruolo sistemico e macrofagico della proteina nel processo di RCT in vivo e siamo arrivati a stabilire che l'apoE nel macrofago, più che il suo effetto nella circolazione sistemica, è rilevante per tale processo. Nell'ambito della mio dottorato di ricerca, è stato valutato inizialmente l'RCT su topi WT iniettati con macrofagi WT o apoE<sup>-/-</sup>. L'assenza della proteina a livello macrofagico causa una significativa riduzione nel contenuto di [<sup>3</sup>H]-colesterolo nei vari distretti (plasma, fegato e feci), rispetto agli animali controllo. La quantificazione del contenuto totale di colesterolo radiomarcato mobilizzato dai macrofagi nei topi apoE<sup>-/-</sup> mostra un decremento pari al 29%, rispetto ai topi WT. A supporto di ciò, abbiamo comparato la capacità di macrofagi estratti dal peritoneo di topi WT e apoE<sup>-/-</sup> nel rilasciare colesterolo dalla cellula verso accettori extracellulari quali plasma di topo WT, osservando una minor abilità da parte delle cellule dei topi apoE<sup>-/-</sup> di promuovere tale processo. Il contributo dell'apoE endogena nel facilitare l'efflusso lipidico da macrofagi ad apoAI o HDL è ormai documentato in letteratura (Hayek et al. 1994). Il nostro dato conferma tale osservazione in un ambito fisiologico, essendo stato l'accettore da noi utilizzato plasma intero murino. Dato che si ripete anche in assenza di accettori extracellulari, in linea con il lavoro di (Yancey et al. 2007), in cui viene dimostrato che il rilascio di colesterolo da macrofagi apoE<sup>-/-</sup> è ridotto rispetto ai WT. L'aumento del

meccanismi di efflusso del colesterolo apoE-dipendente, suggerisce che l'apoE selettivamente espresso nel macrofago migliora il processo di RCT in vivo mediante un incremento della capacità del colesterolo di essere trasportato al fegato e poi alle feci. In accordo con questa osservazione è stato osservato un incremento dei livelli di aterosclerosi in topi controllo ricevanti macrofagi apoE<sup>-/-</sup>, in assenza di cambiamenti riscontrati nel profilo lipoproteico del plasma di questi animali.

Per valutare il contributo dell'apoE sistemica, abbiamo quantificato l'RCT in topi WT o apoE<sup>-/-</sup> ricevanti macrofagi WT. I risultati ottenuti nei due RCT sono paragonabili, difatti il contenuto di colesterolo marcato nel plasma di topi WT/apoE<sup>-/-</sup> è superiore di circa 2.5 volte rispetto ai livelli riscontrati nei topi WT/WT. Situazione differente negli altri distretti interessati ai processi di RCT, dove la concentrazione di colesterolo è paragonabile. Dalla somma della radioattività trovata nei diversi distretti, l'RCT totale è uguale, se non leggermente più elevato nei topi in cui è assente l'apoE. Pertanto, la presenza dell'apolipoproteina E nel macrofago è sufficiente a ripristinare una situazione normale di RCT in topi apoE<sup>-/-</sup> dislipidemici, in accordo con la dimostrazione che il trapianto di midollo osseo proveniente da topi normali in topi apoE<sup>-/-</sup> ne riduce l'aterosclerosi, grazie alla secrezione e l'espressione dell'apoE nei macrofagi. Dall'osservazione, quindi, di un RCT che ritorna normale quando l'apoE è assente a livello sistemico, ma espressa nel macrofago, si è andati a valutare il meccanismo coinvolto in tale effetto, attraverso la quantificazione del potenziale di efflusso del plasma o della frazione HDL dei topi apoE<sup>-/-</sup> in confronto a quello dei topi WT. È stato misurato l'efflusso di colesterolo da macrofagi WT verso HDL di topi WT e apoE<sup>-/-</sup>. La capacità del plasma di guidare l'efflusso cellulare di colesterolo dipende in parte dalla frazione HDL, la cui composizione quali-quantitativa influenza i diversi meccanismi di efflusso. Sorprendentemente, le HDL provenienti da topi apoE<sup>-/-</sup> promuovono un efflusso di colesterolo maggiore rispetto alla capacità dimostrata dalle HDL di topi WT. Trattando le cellule con probucolo, inibitore specifico per il trasportatore ABCA1, si è osservato una marcata riduzione nell'abilità del plasma di topi apoE<sup>-/-</sup> di rilasciare colesterolo dalle cellule. Da qui l'ipotesi che le HDL provenienti dai topi

apoE<sup>-/-</sup> siano ricche di particelle che interagiscono in modo specifico con ABCA1. Dall'analisi elettroforetica sulla sottopopolazione delle HDL, si evince la presenza di un'intatta porzione pre $\beta$ -HDL, ligando preferenziale del trasportatore ABCA1 (Favari et al. 2004). La riduzione di apoAI e HDL nei topi apoE<sup>-/-</sup> indicano la presenza di particelle apoAI lipid poor, che dimostrano come l'assenza dell'apoE a livello sistemico è associata ad un riarrangiamento della composizione delle HDL, in grado di produrre ligandi extracellulari efficienti nel promuovere il primo step dell'RCT. Poiché il plasma è in grado di promuovere uno scambio bidirezionale di colesterolo con la cellula, abbiamo inoltre valutato il flusso netto di colesterolo, e quindi l'efflusso e l'influsso di colesterolo promosso dal plasma. La predominante componente di lipoproteine ricche in apoB nel plasma di topi apoE<sup>-/-</sup> dovrebbe promuovere un influsso di colesterolo maggiore per diffusione passiva o mediante recettori scavenger. L'assenza di apoE nel plasma e il conseguente riarrangiamento quali-quantitativo delle lipoproteine circolanti non influenza dunque la capacità del plasma di scambiare colesterolo con la cellula, indicando come le variazioni del profilo lipoproteico non si riflettano in variazioni nel meccanismo di influsso ed efflusso cellulare. Pertanto, i risultati permettono di dimostrare come l'apoE sistemica non sia essenziale nel processo di RCT in vivo poiché non è determinante nel primo stadio dell'RCT.

Per la prima volta, possiamo quindi affermare dai nostri dati che, l'apoE da un lato gioca un ruolo fondamentale nel meccanismo di RCT macrofagico in vivo, poiché la sua completa delezione è associata ad una riduzione pari al 30% di tale processo; e dall'altro, che questo effetto può essere correlato all'espressione dell'apolipoproteina E nel macrofago, in grado di promuovere il processo di efflusso cellulare di colesterolo.

## Discussione 2: Studio ACAT2

L'inibizione dell'esterificazione intracellulare del colesterolo previene l'accumulo del colesterolo estere a livello delle arterie, ed è considerata una potenziale strategia nel prevenire l'aterosclerosi. Oggi molte informazioni sono state ricavate dallo studio basato sulla delezione di geni come l'ACAT1 e ACAT2 su modelli murini. In animali knockout per l'ACAT1, alimentati con dieta ipercolesterolemica, l'assenza del gene comporta un'alterazione del metabolismo lipidico con conseguente accumulo di colesterolo libero, responsabile quest'ultimo della formazione di lesioni a livello della pelle e del cervello. Le lesioni aterosclerotiche nei topi apoE<sup>-/-</sup> e LDLr<sup>-/-</sup> mancanti del gene per tale enzima, mostrano una riduzione dei livelli di steroli neutri e di macrofagi. Al contrario, la delezione del gene per l'ACAT2 sembra avere un ruolo ateroprotettivo. Difatti, un possibile effetto protettivo contro tale disordine è stato ottenuto riducendo nei topi l'attività epatica dell'enzima ACAT2 in seguito al trattamento con oligonucleotidi antisenso (ASO), in cui vi è una down-regulation dell'enzima. Usando lo stesso approccio terapeutico, nel nostro studio, abbiamo precedentemente trattato topi WT e double knockout per i recettori LXR  $\alpha$  e  $\beta$  (LXR DOKO) con una dieta al 10% di soluzione salina e 0.2% di colesterolo (w/w), per 4 settimane e per altre 4 settimane con ASO6 e l'ASO controllo.

È stato dimostrato che la mancata attività dell'enzima ACAT2 nei topi porta ad un incremento dei livelli di trigliceridi nel plasma, con conseguente riduzione degli stessi nel fegato (Rudel et al. 2005). La down-regulation di ACAT2 non sembra influenzare i livelli di colesterolo libero nel fegato in entrambi i topi, come confermato anche dallo studio di Brown dove mediante l'utilizzo di composti ASO (Brown et al. 2008), la concentrazione di colesterolo nelle apoB è ridotta e le HDL invariate. Quindi nonostante un decremento del colesterolo estere nel fegato degli animali trattati con ASO, i livelli di colesterolo libero non sono aumentati e non è stata promossa alcun tipo di escrezione degli steroli neutri.

In un recente studio condotto su pazienti affetti da calcoli biliari, confrontati con pazienti sani, è stata dimostrata una relazione inversa tra l'attività epatica dell'ACAT2 e il livello plasmatico delle HDL e apoA1. Questo risultato è in linea con l'ipotesi fatta a priori secondo cui, in presenza di una down-regulation dell'attività enzimatica dell'ACAT2 a livello epatico, il colesterolo libero può mediare l'efflusso attraverso il trasportatore ABCA1 ad apoA1, con conseguente formazione di HDL nascenti. Dallo studio di Brown e collaboratori su topi knockout esclusivamente per apoB-100 e LDLr si evince che, essendo i topi caratterizzati da un incremento delle apoB-100 e un decremento di LDLr si ha una secrezione maggiore di VLDL, con ridotta clearance delle LDL, che potrebbe mascherare l'effetto positivo dell'inibizione dell'ACAT2 sulle HDL attraverso il processo mediato da ABCA1. Si ha quindi un aumento del colesterolo libero nelle particelle apoB-100, usato come substrato della sintesi di acidi biliari, più che per l'efflusso ad apoA1.

In questo studio abbiamo dimostrato che una ridotta funzionalità epatica dell'ACAT2 è associata ad un incremento dell'espressione della proteina ABCA1 nel fegato, e questo ci ha suggerito il meccanismo attraverso cui una ridotta attività epatica dell'ACAT2 può regolare i livelli di HDL nel plasma. Parallelamente a tale effetto, in seguito al trattamento con ASO6, i livelli di HDL aumentano nel colesterolo totale e in maniera significativa nel colesterolo libero. Dall'analisi bidimensionale si è notato che in topi WT trattati con ASO6 non varia la porzione pre $\beta$ -HDL, ma si nota una variazione nella distribuzione delle sottopopolazioni delle HDL in particolare della porzione  $\alpha$ , che tendono a spostarsi verso particelle più larghe. Un trend differente si ha nei topi LXR DOKO, in cui la ridotta attività dell'ACAT2 porta ad un aumento dimensionale delle pre $\beta$ -HDL e lo spostamento delle  $\alpha$  verso particelle più piccole. La prematura interruzione dello studio ILLUMINATE (Barter et al. 2007), in cui i livelli di HDL erano farmacologicamente elevati, ha posto l'attenzione verso la necessità di caratterizzare l'abilità delle HDL nel mediare il rilascio di colesterolo dalle cellule periferiche (fenomeno noto con il nome di "funzionalità delle HDL"). L'efflusso di colesterolo si manifesta mediante diversi meccanismi caratterizzati dalla presenza di accettori preferenziali: diffusione passiva del colesterolo verso HDL mature;

efflusso bidirezionale mediato da SR-B1 verso HDL mature; efflusso unidirezionale mediato da ABCA1 verso apoA1 lipid poor e pre $\beta$ -HDL nascenti, e da ABCG1 verso pre $\beta$ -HDL e HDL mature. La concentrazione e la funzionalità delle HDL sono il fattore determinante del siero di promuovere l'efflusso di colesterolo dalle cellule, il cosiddetto potenziale di efflusso (Zanotti et al. 2008).

Le modificazioni nella diversa distribuzione delle sottoclassi delle HDL si trasformano in un effetto positivo della capacità dei sieri di topi trattati con ASO6 di promuovere l'efflusso di colesterolo. Il siero di topi WT trattati con ASO6 ha evidenziato un incremento del potenziale di efflusso per diffusione passiva e mediata dalla proteina SR-B1, mentre il siero di topi LXR DOKO trattati con ASO6 ha mostrato un'elevata capacità nell'accettare colesterolo libero attraverso l'efflusso ABCA1-mediato, confermando così quanto descritto dall'analisi bidimensionale.

L'uso di oligonucleotidi antisenso, come l'ASO6, nei modelli murini è utile nel ridurre l'attività epatica dell'ACAT2, rilevando così un nuovo processo mediante il quale il fegato contribuisce al metabolismo delle HDL. L'ACAT2, difatti, sembra essere un importante player negli epatociti, in grado di promuovere l'efflusso di colesterolo sia verso le lipoproteine contenenti le apoB sia verso le particelle contenenti apoA1. Si può affermare inoltre, che quando la sua attività a livello epatico è ridotta, il colesterolo libero sembra essere veicolato preferenzialmente verso l'apoA1, mediante il trasportatore ABCA1. Il tutto sembra condurre ad una modificazione nella distribuzione e funzionalità delle sottoclassi delle HDL.

### **Discussione 3: Studio manidipina/delapril**

L'attività di ricerca degli ultimi anni ha evidenziato diversi meccanismi coinvolti nella patologia aterosclerotica, tra i quali l'infiammazione vascolare, la formazione di radicali liberi da specie reattive dell'ossigeno e le alterazioni della funzione endoteliale (Schmieder

et al. 2007). In modo particolare, studi clinici e sperimentali hanno dimostrato che l'attivazione del sistema renina–angiotensina (RAS), mediante il legame dell'angiotensina II (AngII) ai loro recettori AT1, riveste un ruolo determinante nei meccanismi sopra citati.

La produzione di citochine proinfiammatorie è fondamentale nello sviluppo e progressione della malattia. Un'elevata concentrazione plasmatica di queste sostanze, quali l'interleuchina 1 (IL-1), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), e soprattutto l'interleuchina 6 (IL-6), è stata associata ad eventi avversi nei pazienti affetti da aterosclerosi coronarica. È noto, inoltre, che l'iniezione di AngII nei topi knockout per l'apolipoproteina E (apoE<sup>-/-</sup>), modello animale dell'aterogenesi, aumenta l'uptake di OxLDL nei macrofagi peritoneali, con un meccanismo mediato dall'incremento di IL-6 (Nickenig et al. 1997).

È stato osservato come l'inibizione della formazione di AngII potrebbe in parte spiegare l'effetto antiaterogeno che gli ACE inibitori hanno dimostrato di avere negli studi su animali da laboratorio. Nel topo ApoE<sup>-/-</sup>, il captopril si è dimostrato in grado di ridurre del 70% l'estensione della placca aterosclerotica nell'aorta (Hayek et al. 1998). Il delapril è in grado di inibire, in modo dose-dipendente, lo sviluppo dell'aterosclerosi nei conigli alimentati con dieta ipercolesterolemica, con un effetto comparabile al captopril (Hernandez et al. 1998). Un altro studio, condotto su topi ApoE<sup>-/-</sup>, ha dimostrato che sia l'inibitore dell'ACE, fosinopril, che l'antagonista del recettore dell'AngII, losartan, attenuano l'aterosclerosi, indipendentemente dall'abbassamento della pressione; in modo particolare la somministrazione del fosinopril ha portato ad una significativa riduzione della placca. Risultati analoghi sono stati ottenuti anche con enalapril nel medesimo modello sperimentale (da Cunha et al. 2005).

La classe dei farmaci quale i calcio antagonisti hanno dimostrato di avere proprietà pleiotropiche ateroprotettive indipendenti dall'effetto primario di riduzione della pressione sanguigna (Bellosta et al. 2000).



Tra questi, quelli di natura diidropiridinica hanno mostrato per primi un'azione antiaterosclerotica diretta in diversi modelli sperimentali (Cristofori et al. 2000).

La lacidipina è in grado di ridurre l'estensione della lesione nell'aorta di topi ApoE<sup>-/-</sup>, senza alterare il profilo lipidico plasmatico degli animali (Cristofori et al. 2004). Recentemente è stato dimostrato uguale effetto dell'amlodipina su topi ApoE<sup>-/-</sup> trattati con dieta ipercolesterolemica (Yoshii et al. 2006).

Nel nostro laboratorio abbiamo dimostrato come i calcio antagonisti diidropiridinici lipofili di ultima generazione siano capaci di esercitare un effetto antiaterosclerotico diretto, modulando il metabolismo del colesterolo nei macrofagi, che si accompagna ad un ridotto accumulo di lipidi nell'aorta degli animali trattati (Bernini et al. 1997).

Così come la lacidipina, la lercanidipina ha dimostrato di indurre effetti antiaterosclerotici nel coniglio senza alterare i livelli plasmatici di colesterolo e la pressione sanguigna (Canavesi et al. 2004).

Dai risultati complessivi ottenuti nello studio non si è possibile mettere in luce una particolare efficacia dell'associazione manidipina/delapril sulla lesione ateromasica nel modello murino apoE<sup>-/-</sup>. Il contenuto dei lipidi, espresso come media percentuale, a livello delle valvole cardiache indica una tendenza ad un ridotto accumulo nei topi trattati con l'associazione dei farmaci al dosaggio più alto (0,05-0,15%), rispetto ai topi trattati con il solo veicolo. Risultato opposto è stato riscontrato nell'aorta, dove a livello dell'aorta ascendente sembra addirittura aumentare la lesione. Questo dato non è confermato dall'analisi del contenuto di lipidi del tratto toracico dell'aorta, dove si osserva una riduzione della concentrazione del colesterolo totale negli animali trattati con i farmaci. Riduzione, maggiore nei topi alimentati con la dose minore (0,02-0,06%), che è attribuibile alla marcata riduzione del colesterolo in forma esterificata, parzialmente bilanciata da un significativo aumento della forma libera. Tale dato appare in accordo con i risultati precedentemente ottenuti nel nostro laboratorio, in cui è stato dimostrato come la

manidipina in colture cellulari di macrofagi sia in grado di interferire col metabolismo cellulare del colesterolo, suggerendo che l'effetto riscontrato in vivo nel presente studio possa anche coinvolgere un effetto diretto di tale farmaco sulla componente macrofagica della lesione aterosclerotica. (Costa et al.).

Di particolare rilievo appare il dato che dimostra un significativo effetto dell'associazione manidipina/delapril di tipo antinfiammatorio e protettivo a livello endoteliale con una riduzione dell'espressione di VCAM1. Anche questo dato appare coerente con gli studi da noi condotti nelle colture cellulari di endotelio dove si osserva un effetto inibitorio della manidipina sulla secrezione di IL-6 e IL-8. A questo riguardo appare inoltre di rilievo il trend di riduzione della IL-6 circolante osservato nel presente studio suggerendo che l'associazione manidipina/delapril sia in grado di espletare un effetto anche sistemico di tipo antinfiammatorio rilevante ai fini di un'azione antiaterosclerotica.

Riteniamo pertanto che un approfondimento dell'effetto dell'associazione manidipina/delapril in un appropriato modello animale di infiammazione e aterosclerosi, quali i topi obesi o diabetici, possa essere di grande interesse ai fini di documentare le proprietà protettive antiaterosclerotiche di tale terapia farmacologica. Tale risultato appare di particolare interesse considerando il ruolo di tali patologie associate all'ipertensione nei soggetti ad alto rischio cardiovascolare affetti da sindrome metabolica.

## *Ringraziamenti*

*A conclusione di questo lavoro desidero rivolgere un sentito ringraziamento alla coordinatrice del corso di dottorato Prof.ssa Elisabetta Barocelli e al mio tutor Prof. Franco Bernini per avermi dato la possibilità di prendere parte a questo interessante progetto presso il laboratorio da lui diretto. Al Prof. Bernini va anche il mio Grazie per avermi permesso di vivere una nuova esperienza di ricerca presso il Karolinska Institutet di Stoccolma, nel laboratorio diretto dal Prof. Paolo Parini, che mi ha guidato e assistito passo dopo passo in questa stimolante avventura.*

*Un Grazie ricco di affetto e stima va anche a Matteo e Ilaria, miei compagni di viaggio e pazienti collaboratori.*

## Bibliografia

- Anderson, R. A., Joyce, C., Davis, M., Reagan, J. W., Clark, M., Shelness, G. S. and Rudel, L. L. (1998). "Identification of a form of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase specific to liver and intestine in nonhuman primates." J Biol Chem **273**(41): 26747-54.
- Anoop, S., Misra, A., Meena, K. and Luthra, K. "Apolipoprotein E polymorphism in cerebrovascular & coronary heart diseases." Indian J Med Res **132**: 363-78.
- Arai, T., Wang, N., Bezouevski, M., Welch, C. and Tall, A. R. (1999). "Decreased atherosclerosis in heterozygous low density lipoprotein receptor-deficient mice expressing the scavenger receptor BI transgene." J Biol Chem **274**(4): 2366-71.
- Arakawa, K. and Urata, H. (2000). "Hypothesis regarding the pathophysiological role of alternative pathways of angiotensin II formation in atherosclerosis." Hypertension **36**(4): 638-41.
- Attie, A. D., Kastelein, J. P. and Hayden, M. R. (2001). "Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis." J Lipid Res **42**(11): 1717-26.
- Bartelt, A., Beil, F. T., Schinke, T., Roeser, K., Ruether, W., Heeren, J. and Niemeier, A. "Apolipoprotein E-dependent inverse regulation of vertebral bone and adipose tissue mass in C57Bl/6 mice: modulation by diet-induced obesity." Bone **47**(4): 736-45.
- Barter, P. J. (2002). "Hugh sinclair lecture: the regulation and remodelling of HDL by plasma factors." Atheroscler Suppl **3**(4): 39-47.
- Barter, P. J., Caulfield, M., Eriksson, M., Grundy, S. M., Kastelein, J. J., Komajda, M., Lopez-Sendon, J., Mosca, L., Tardif, J. C., Waters, D. D., Shear, C. L., Revkin, J. H., Buhr, K. A., Fisher, M. R., Tall, A. R. and Brewer, B. (2007). "Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events." The New England journal of medicine **357**(21): 2109-22.
- Bell, T. A., 3rd, Brown, J. M., Graham, M. J., Lemonidis, K. M., Crooke, R. M. and Rudel, L. L. (2006). "Liver-specific inhibition of acyl-coenzyme a:cholesterol acyltransferase 2 with antisense oligonucleotides limits atherosclerosis development in apolipoprotein B100-only low-density lipoprotein receptor-/- mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(8): 1814-20.

- Bell, T. A., 3rd, Kelley, K., Wilson, M. D., Sawyer, J. K. and Rudel, L. L. (2007). "Dietary fat-induced alterations in atherosclerosis are abolished by ACAT2-deficiency in ApoB100 only, LDLr<sup>-/-</sup> mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(6): 1396-402.
- Bellosta, S. and Bernini, F. (2000). "Lipophilic calcium antagonists in antiatherosclerotic therapy." Curr Atheroscler Rep **2**(1): 76-81.
- Bellosta, S., Mahley, R. W., Sanan, D. A., Murata, J., Newland, D. L., Taylor, J. M. and Pitas, R. E. (1995). "Macrophage-specific expression of human apolipoprotein E reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice." J Clin Invest **96**(5): 2170-9.
- Bernini, F., Canavesi, M., Bernardini, E., Scurati, N., Bellosta, S. and Fumagalli, R. (1997). "Effect of lacidipine on cholesterol esterification: in vivo and in vitro studies." Br J Pharmacol **122**(6): 1209-15.
- Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S. M., Zhang, L. H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J. A., Molhuizen, H. O., Loubser, O., Ouellette, B. F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K. J., Sensen, C. W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J. J., Genest, J., Jr. and Hayden, M. R. (1999). "Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency." Nat Genet **22**(4): 336-45.
- Brown, J. M., Bell, T. A., 3rd, Alger, H. M., Sawyer, J. K., Smith, T. L., Kelley, K., Shah, R., Wilson, M. D., Davis, M. A., Lee, R. G., Graham, M. J., Croke, R. M. and Rudel, L. L. (2008). "Targeted depletion of hepatic ACAT2-driven cholesterol esterification reveals a non-biliary route for fecal neutral sterol loss." J Biol Chem **283**(16): 10522-34.
- Calabresi, L., Favari, E., Moleri, E., Adorni, M. P., Pedrelli, M., Costa, S., Jessup, W., Gelissen, I. C., Kovanen, P. T., Bernini, F. and Franceschini, G. (2009). "Functional LCAT is not required for macrophage cholesterol efflux to human serum." Atherosclerosis **204**(1): 141-6.
- Canavesi, M., Baldini, N., Leonardi, A., Sironi, G., Bellosta, S. and Bernini, F. (2004). "In vitro inhibitory effect of lercanidipine on cholesterol accumulation and matrix metalloproteinases secretion by macrophages." J Cardiovasc Pharmacol **44**(4): 416-22.
- Chang, C. C., Huh, H. Y., Cadigan, K. M. and Chang, T. Y. (1993). "Molecular cloning and functional expression of human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese hamster ovary cells." J Biol Chem **268**(28): 20747-55.

- Chang, C. C., Sakashita, N., Ornvold, K., Lee, O., Chang, E. T., Dong, R., Lin, S., Lee, C. Y., Strom, S. C., Kashyap, R., Fung, J. J., Farese, R. V., Jr., Patoiseau, J. F., Delhon, A. and Chang, T. Y. (2000). "Immunological quantitation and localization of ACAT-1 and ACAT-2 in human liver and small intestine." J Biol Chem 275(36): 28083-92.
- Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A. T., Neve, B., Torra, I. P., Teissier, E., Minnich, A., Jaye, M., Duverger, N., Brewer, H. B., Fruchart, J. C., Clavey, V. and Staels, B. (2001). "PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway." Nat Med 7(1): 53-8.
- Chobanian, A. V., Bakris, G. L., Black, H. R., Cushman, W. C., Green, L. A., Izzo, J. L., Jr., Jones, D. W., Materson, B. J., Oparil, S., Wright, J. T., Jr., Roccella, E. J., National Heart, L. a. B. I. J. N. C. o. P. D. E. a. T. o. H. B. P. and National High Blood Pressure Education Program Coordinating, C. (2003). "The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report." JAMA 289(19): 2560-72.
- Coca, A. (2007). "Manidipine plus delapril in patients with Type 2 diabetes and hypertension: reducing cardiovascular risk and end-organ damage." Expert Rev Cardiovasc Ther 5(2): 147-59.
- Costa, S., Zimetti, F., Pedrelli, M., Cremonesi, G. and Bernini, F. "Manidipine reduces pro-inflammatory cytokines secretion in human endothelial cells and macrophages." Pharmacol Res 62(3): 265-70.
- Cristofori, P., Crivellente, F., Campagnola, M., Pasini, A. F., Garbin, U., Rigoni, A., Tosetti, M., Turton, J., Faustinelli, I. and Cominacini, L. (2004). "Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice treated with lacidipine is associated with a decreased susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation." Int J Exp Pathol 85(2): 105-14.
- Cristofori, P., Lanzoni, A., Quartaroli, M., Pastorino, A. M., Zancanaro, C., Cominacini, L., Gaviraghi, G. and Turton, J. (2000). "The calcium-channel blocker lacidipine reduces the development of atherosclerotic lesions in the apoE-deficient mouse." J Hypertens 18(10): 1429-36.
- Cuchel, M. and Rader, D. J. (2006). "Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis?" Circulation 113(21): 2548-55.
- Curtiss, L. K. (2000). "ApoE in atherosclerosis : a protein with multiple hats." Arterioscler Thromb Vasc Biol 20(8): 1852-3.

- da Cunha, V., Tham, D. M., Martin-McNulty, B., Deng, G., Ho, J. J., Wilson, D. W., Rutledge, J. C., Vergona, R., Sullivan, M. E. and Wang, Y. X. (2005). "Enalapril attenuates angiotensin II-induced atherosclerosis and vascular inflammation." Atherosclerosis **178**(1): 9-17.
- Davignon, J. (1986). "Medical management of hyperlipidemia and the role of probucol." Am J Cardiol **57**(16): 22H-8H.
- Favari, E., Calabresi, L., Adorni, M. P., Jessup, W., Simonelli, S., Franceschini, G. and Bernini, F. (2009). "Small discoidal pre-beta1 HDL particles are efficient acceptors of cell cholesterol via ABCA1 and ABCG1." Biochemistry **48**(46): 11067-74.
- Favari, E., Lee, M., Calabresi, L., Franceschini, G., Zimetti, F., Bernini, F. and Kovanen, P. T. (2004). "Depletion of pre-beta-high density lipoprotein by human chymase impairs ATP-binding cassette transporter A1- but not scavenger receptor class B type I-mediated lipid efflux to high density lipoprotein." The Journal of biological chemistry **279**(11): 9930-6.
- Favari, E., Zanotti, I., Zimetti, F., Ronda, N., Bernini, F. and Rothblat, G. H. (2004). "Probucol inhibits ABCA1-mediated cellular lipid efflux." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(12): 2345-50.
- Fazio, S. and Linton, M. (2006). "Failure of ACAT inhibition to retard atherosclerosis." The New England journal of medicine **354**(12): 1307-9.
- Fliser, D., Buchholz, K., Haller, H. and Investigators, E. U. T. o. O. a. P. i. I. a. A. (2004). "Antiinflammatory effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade in hypertensive patients with microinflammation." Circulation **110**(9): 1103-7.
- Franceschini, G., Maderna, P. and Sirtori, C. R. (1991). "Reverse cholesterol transport: physiology and pharmacology." Atherosclerosis **88**(2-3): 99-107.
- Getz, G. S. and Reardon, C. A. (2009). "Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall." J Lipid Res **50 Suppl**: S156-61.
- Glomset, J. A. (1968). "The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction." J Lipid Res **9**(2): 155-67.
- Greenow, K., Pearce, N. J. and Ramji, D. P. (2005). "The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis." J Mol Med **83**(5): 329-42.

- Hayek, T., Attias, J., Smith, J., Breslow, J. L. and Keidar, S. (1998). "Antiatherosclerotic and antioxidative effects of captopril in apolipoprotein E-deficient mice." J Cardiovasc Pharmacol **31**(4): 540-4.
- Hayek, T., Oiknine, J., Brook, J. G. and Aviram, M. (1994). "Role of HDL apolipoprotein E in cellular cholesterol efflux: studies in apo E knockout transgenic mice." Biochem Biophys Res Commun **205**(2): 1072-8.
- Hernandez, A., Barberi, L., Ballerio, R., Testini, A., Ferioli, R., Bolla, M., Natali, M., Folco, G. and Catapano, A. L. (1998). "Delapril slows the progression of atherosclerosis and maintains endothelial function in cholesterol-fed rabbits." Atherosclerosis **137**(1): 71-6.
- Huang, Z. H., Lin, C. Y., Oram, J. F. and Mazzone, T. (2001). "Sterol efflux mediated by endogenous macrophage ApoE expression is independent of ABCA1." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(12): 2019-25.
- Iverson, S. J., Lang, S. L. and Cooper, M. H. (2001). "Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue." Lipids **36**(11): 1283-7.
- Jawien, J. (2008). "New insights into immunological aspects of atherosclerosis." Pol Arch Med Wewn **118**(3): 127-31.
- Jessup, W., Gelissen, I. C., Gaus, K. and Kritharides, L. (2006). "Roles of ATP binding cassette transporters A1 and G1, scavenger receptor BI and membrane lipid domains in cholesterol export from macrophages." Curr Opin Lipidol **17**(3): 247-57.
- Jiang, X., Francone, O. L., Bruce, C., Milne, R., Mar, J., Walsh, A., Breslow, J. L. and Tall, A. R. (1996). "Increased prebeta-high density lipoprotein, apolipoprotein AI, and phospholipid in mice expressing the human phospholipid transfer protein and human apolipoprotein AI transgenes." J Clin Invest **98**(10): 2373-80.
- Jiang, X. C., Bruce, C., Mar, J., Lin, M., Ji, Y., Francone, O. L. and Tall, A. R. (1999). "Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels." J Clin Invest **103**(6): 907-14.
- Knight, B. L. (2004). "ATP-binding cassette transporter A1: regulation of cholesterol efflux." Biochem Soc Trans **32**(Pt 1): 124-7.



- Kobayashi, A., Takanezawa, Y., Hirata, T., Shimizu, Y., Misasa, K., Kioka, N., Arai, H., Ueda, K. and Matsuo, M. (2006). "Efflux of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine by ABCG1." J Lipid Res 47(8): 1791-802.
- Kozarsky, K. F., Donahee, M. H., Rigotti, A., Iqbal, S. N., Edelman, E. R. and Krieger, M. (1997). "Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels." Nature 387(6631): 414-7.
- Lange, Y. (1991). "Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts." J Lipid Res 32(2): 329-39.
- Langer, C., Huang, Y., Cullen, P., Wiesenhuber, B., Mahley, R. W., Assmann, G. and von Eckardstein, A. (2000). "Endogenous apolipoprotein E modulates cholesterol efflux and cholesteryl ester hydrolysis mediated by high-density lipoprotein-3 and lipid-free apolipoproteins in mouse peritoneal macrophages." J Mol Med 78(4): 217-27.
- Le Goff, W., Zheng, P., Brubaker, G. and Smith, J. D. (2006). "Identification of the cAMP-responsive enhancer of the murine ABCA1 gene: requirement for CREB1 and STAT3/4 elements." Arterioscler Thromb Vasc Biol 26(3): 527-33.
- Lee, R. G., Willingham, M. C., Davis, M. A., Skinner, K. A. and Rudel, L. L. (2000). "Differential expression of ACAT1 and ACAT2 among cells within liver, intestine, kidney, and adrenal of nonhuman primates." J Lipid Res 41(12): 1991-2001.
- Lehtinen, S., Lehtimäki, T., Sisto, T., Salenius, J. P., Nikkila, M., Jokela, H., Koivula, T., Ebeling, F. and Ehnholm, C. (1995). "Apolipoprotein E polymorphism, serum lipids, myocardial infarction and severity of angiographically verified coronary artery disease in men and women." Atherosclerosis 114(1): 83-91.
- Lewis, G. F. and Rader, D. J. (2005). "New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport." Circ Res 96(12): 1221-32.
- Lin, C. Y., Huang, Z. H. and Mazzone, T. (2001). "Interaction with proteoglycans enhances the sterol efflux produced by endogenous expression of macrophage apoE." J Lipid Res 42(7): 1125-33.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." Nature 407(6801): 233-41.
- Mahley, R. W., Huang, Y. and Weisgraber, K. H. (2006). "Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport." J Clin Invest 116(5): 1226-9.

- Mahley, R. W. and Rall, S. C., Jr. (2000). "Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein." Annu Rev Genomics Hum Genet **1**: 507-37.
- Mahley, R. W., Weisgraber, K. H. and Huang, Y. (2009). "Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS." J Lipid Res **50 Suppl**: S183-8.
- Martins, I. J., Berger, T., Sharman, M. J., Verdile, G., Fuller, S. J. and Martins, R. N. (2009). "Cholesterol metabolism and transport in the pathogenesis of Alzheimer's disease." J Neurochem **111**(6): 1275-308.
- Mazzone, T. and Reardon, C. (1994). "Expression of heterologous human apolipoprotein E by J774 macrophages enhances cholesterol efflux to HDL3." J Lipid Res **35**(8): 1345-53.
- McCormack, P. L. and Keating, G. M. (2006). "Delapril/manidipine." Drugs **66**(7): 961-9.
- Meiner, V., Tam, C., Gunn, M. D., Dong, L. M., Weisgraber, K. H., Novak, S., Myers, H. M., Erickson, S. K. and Farese, R. V., Jr. (1997). "Tissue expression studies on the mouse acyl-CoA: cholesterol acyltransferase gene (Acact): findings supporting the existence of multiple cholesterol esterification enzymes in mice." J Lipid Res **38**(9): 1928-33.
- Merched, A., Xia, Y., Visvikis, S., Serot, J. M. and Siest, G. (2000). "Decreased high-density lipoprotein cholesterol and serum apolipoprotein AI concentrations are highly correlated with the severity of Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **21**(1): 27-30.
- Miller, G. J. and Miller, N. E. (1975). "Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease." Lancet **1**(7897): 16-9.
- Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L. and Ross, R. (1994). "ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree." Arterioscler Thromb **14**(1): 133-40.
- Nickenig, G., Sachinidis, A., Michaelson, F., Bohm, M., Seewald, S. and Vetter, H. (1997). "Upregulation of vascular angiotensin II receptor gene expression by low-density lipoprotein in vascular smooth muscle cells." Circulation **95**(2): 473-8.
- Oram, J. F. (2002). "ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking." Curr Opin Lipidol **13**(4): 373-81.

- Otero, M. L. (2007). "Manidipine-delapril combination in the management of hypertension." Vasc Health Risk Manag 3(3): 255-63.
- Panagotopulos, S. E., Witting, S. R., Horace, E. M., Hui, D. Y., Maiorano, J. N. and Davidson, W. S. (2002). "The role of apolipoprotein A-I helix 10 in apolipoprotein-mediated cholesterol efflux via the ATP-binding cassette transporter ABCA1." J Biol Chem 277(42): 39477-84.
- Pendse, A. A., Arbones-Mainar, J. M., Johnson, L. A., Altenburg, M. K. and Maeda, N. (2009). "Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond." J Lipid Res 50 Suppl: S178-82.
- Poirier, J. (2000). "Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. A role in amyloid catabolism." Ann N Y Acad Sci 924: 81-90.
- Pramfalk, C., Davis, M. A., Eriksson, M., Rudel, L. L. and Parini, P. (2005). "Control of ACAT2 liver expression by HNF1." J Lipid Res 46(9): 1868-76.
- Qin, S., Kawano, K., Bruce, C., Lin, M., Bisgaier, C., Tall, A. R. and Jiang, X. (2000). "Phospholipid transfer protein gene knock-out mice have low high density lipoprotein levels, due to hypercatabolism, and accumulate apoA-IV-rich lamellar lipoproteins." J Lipid Res 41(2): 269-76.
- Rader, D. J., Alexander, E. T., Weibel, G. L., Billheimer, J. and Rothblat, G. H. (2009). "The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis." J Lipid Res 50 Suppl: S189-94.
- Rader, D. J. and Jaye, M. (2000). "Endothelial lipase: a new member of the triglyceride lipase gene family." Curr Opin Lipidol 11(2): 141-7.
- Richard, S. (2005). "Vascular effects of calcium channel antagonists: new evidence." Drugs 65 Suppl 2: 1-10.
- Rigotti, A., Trigatti, B. L., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J. and Krieger, M. (1997). "A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism." Proc Natl Acad Sci U S A 94(23): 12610-5.
- Rudel, L. L., Lee, R. G. and Cockman, T. L. (2001). "Acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase types 1 and 2: structure and function in atherosclerosis." Curr Opin Lipidol 12(2): 121-7.

- Rudel, L. L., Lee, R. G. and Parini, P. (2005). "ACAT2 is a target for treatment of coronary heart disease associated with hypercholesterolemia." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(6): 1112-8.
- Sata, M. and Fukuda, D. "Crucial role of renin-angiotensin system in the pathogenesis of atherosclerosis." J Med Invest **57**(1-2): 12-25.
- Schmieder, R. E., Hilgers, K. F., Schlaich, M. P. and Schmidt, B. M. (2007). "Renin-angiotensin system and cardiovascular risk." Lancet **369**(9568): 1208-19.
- Shi, L., Mao, C., Xu, Z. and Zhang, L. "Angiotensin-converting enzymes and drug discovery in cardiovascular diseases." Drug Discov Today **15**(9-10): 332-41.
- Small, D. M. (2003). "Role of ABC transporters in secretion of cholesterol from liver into bile." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 4-6.
- Song, Y., Stampfer, M. J. and Liu, S. (2004). "Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease." Ann Intern Med **141**(2): 137-47.
- Takahashi, Y. and Smith, J. D. (1999). "Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11358-63.
- Tall, A. R. (2008). "Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins." J Intern Med **263**(3): 256-73.
- Tall, A. R., Yvan-Charvet, L., Terasaka, N., Pagler, T. and Wang, N. (2008). "HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis." Cell Metab **7**(5): 365-75.
- Timmins, J. M., Lee, J. Y., Boudyguina, E., Kluckman, K. D., Brunham, L. R., Mulya, A., Gebre, A. K., Coutinho, J. M., Colvin, P. L., Smith, T. L., Hayden, M. R., Maeda, N. and Parks, J. S. (2005). "Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I." J Clin Invest **115**(5): 1333-42.
- Tsujita, M. and Yokoyama, S. (1996). "Selective inhibition of free apolipoprotein-mediated cellular lipid efflux by probucol." Biochemistry **35**(40): 13011-20.
- Uelmen, P. J., Oka, K., Sullivan, M., Chang, C. C., Chang, T. Y. and Chan, L. (1995). "Tissue-specific expression and cholesterol regulation of acylcoenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) in mice.

- Molecular cloning of mouse ACAT cDNA, chromosomal localization, and regulation of ACAT in vivo and in vitro." J Biol Chem 270(44): 26192-201.
- Van Eck, M., Singaraja, R. R., Ye, D., Hildebrand, R. B., James, E. R., Hayden, M. R. and Van Berkel, T. J. (2006). "Macrophage ATP-binding cassette transporter A1 overexpression inhibits atherosclerotic lesion progression in low-density lipoprotein receptor knockout mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol 26(4): 929-34.
- Walldius, G. and Jungner, I. (2006). "The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy—a review of the evidence." J Intern Med 259(5): 493-519.
- Wang, M. and Briggs, M. R. (2004). "HDL: the metabolism, function, and therapeutic importance." Chem Rev 104(1): 119-37.
- Wang, M. D., Franklin, V. and Marcel, Y. L. (2007). "In vivo reverse cholesterol transport from macrophages lacking ABCA1 expression is impaired." Arterioscler Thromb Vasc Biol 27(8): 1837-42.
- Wang, N., Arai, T., Ji, Y., Rinninger, F. and Tall, A. R. (1998). "Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice." J Biol Chem 273(49): 32920-6.
- Yamashita, S., Sprecher, D. L., Sakai, N., Matsuzawa, Y., Tarui, S. and Hui, D. Y. (1990). "Accumulation of apolipoprotein E-rich high density lipoproteins in hyperalphalipoproteinemic human subjects with plasma cholesteryl ester transfer protein deficiency." J Clin Invest 86(3): 688-95.
- Yancey, P. G., Bortnick, A. E., Kellner-Weibel, G., de la Llera-Moya, M., Phillips, M. C. and Rothblat, G. H. (2003). "Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux." Arterioscler Thromb Vasc Biol 23(5): 712-9.
- Yancey, P. G., Yu, H., Linton, M. F. and Fazio, S. (2007). "A pathway-dependent on apoE, ApoAI, and ABCA1 determines formation of buoyant high-density lipoprotein by macrophage foam cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol 27(5): 1123-31.
- Yoshii, T., Iwai, M., Li, Z., Chen, R., Ide, A., Fukunaga, S., Oshita, A., Mogi, M., Higaki, J. and Horiuchi, M. (2006). "Regression of atherosclerosis by amlodipine via anti-inflammatory and anti-oxidative stress actions." Hypertens Res 29(6): 457-66.

- Zanotti, I., Pedrelli, M., Poti, F., Stomeo, G., Gomaschi, M., Calabresi, L. and Bernini, F. (2010). "Macrophage, But Not Systemic, Apolipoprotein E Is Necessary for Macrophage Reverse Cholesterol Transport In Vivo." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.
- Zanotti, I., Poti, F., Pedrelli, M., Favari, E., Moleri, E., Franceschini, G., Calabresi, L. and Bernini, F. (2008). "The LXR agonist T0901317 promotes the reverse cholesterol transport from macrophages by increasing plasma efflux potential." J Lipid Res 49(5): 954-60.
- Zhang, Y., Da Silva, J. R., Reilly, M., Billheimer, J. T., Rothblat, G. H. and Rader, D. J. (2005). "Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo." The Journal of clinical investigation 115(10): 2870-4.
- Zhang, Y., Zanotti, I., Reilly, M. P., Glick, J. M., Rothblat, G. H. and Rader, D. J. (2003). "Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo." Circulation 108(6): 661-3.